

Iszkémia tolerancia vizsgálata akut alsó végtagi verőér-elzáródások kapcsán

Doktori értekezés

dr. Turóczy Zsolt

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Dr. med. habil. Szijártó Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus
Hivatalos bírálók:	Dr. Kékesi Violetta, Ph.D., egyetemi docens Dr. Dzsinič Csaba, Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Entz László, Ph.D, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Jermendy György, az MTA doktora, címzetes egyetemi tanár Dr. med. habil. Ferencz Andrea Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
2. BEVEZETÉS	8
2.1. A vázizom felépítése	9
2.2. Iszkémiás-reperfúziós károsodása vázizomban	11
2.2.1. Iszkémiás károsodás	11
2.2.2. Reperfúziós károsodás	12
2.2.3. Mikrocirkulációs változások - gyulladásos reakció	14
2.2.4. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás lokális szövődményei	16
2.2.5. Szisztémás szövődmények	17
2.3. Az akut verőér-elzáródás klinikai megjelenése	19
2.3.1. Az alsó végtag iszkémiás károsodását befolyásoló tényezők	20
2.3.2. Diagnózis	20
2.3.3. Revaszkularizációs kezelés	21
2.3.4. Kórlefolyás	22
2.4. Az iszkémiás károsodás mértékének megítélése	23
2.4.1 Az izomkárosodás mértékének megállapítására alkalmas módszerek	23
2.4.2. A sejtek energiaszintjének indirekt meghatározása	24
2.4.3. Kvantitatív módszerek	25
2.5. Kísérletes modellek a végtagi iszkémia vizsgálatára	26

2.5.1. Teljes iszkémiát létrehozó modellek	27
2.5.1.1. Izolált kutya gracilis modell	27
2.5.1.2. Amputációs modellek	28
2.5.1.3. Izomlebenyek alkalmazása	29
2.5.1.4. Külső leszorítás alkalmazása	30
2.5.2. Reziduális perfúziós modellek	31
2.5.2.1. Femorális szintű kirekesztés	32
2.5.2.2. Iliaca szintű kirekesztés	32
2.5.2.3. Aortakirekesztés az infrarenális szakaszon	32
2.5.2.4. Több ér szimultán kirekesztése.....	33
2.6. Posztkondicionálás.....	33
2.7. Esetismertetés	36
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	45
4. MÓDSZEREK.....	48
4.1. Állatkísérletes vizsgálatok	48
4.1.1. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika.....	48
4.1.1.1. Etikai háttér.....	48
4.1.1.2. Állatok	48
4.1.1.3. Csoportbeosztás	48
4.1.1.4. A műtét ideje	50
4.1.1.5. Anesztézia.....	50
4.1.1.6. Hőmérséklet.....	50

4.1.1.7. A műtét menete.....	50
4.1.2. Korroziós preparátumok.....	53
4.1.3. Mikrocirkuláció vizsgálata.....	54
4.1.4. Fénymikroszkópos vizsgálatok.....	55
4.1.5. Elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	55
4.1.6. Izomrost életképesség vizsgálat.....	56
4.1.7. Laboratóriumi vizsgálatok.....	57
4.1.8. Nedvességtartalom meghatározás.....	58
4.2. Klinikai vizsgálatok.....	58
4.2.1. Etikai háttér.....	58
4.2.2. Beválasztási kritériumok.....	58
4.2.3. Betegpopuláció és csoportbeosztás.....	60
4.2.4. Beavatkozások.....	61
4.2.5. Adatgyűjtés.....	61
4.2.6. Vizsgálatok.....	61
4.2.6.1. Fénymikroszkópia.....	61
4.2.6.2. Életképesség.....	62
4.2.7. Utánkövetés.....	62
4.2.8. Vizsgálati végpont.....	62
4.3. Statisztikai feldolgozás.....	63
5. EREDMÉNYEK.....	64
5.1. I. Kísérlet: A reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata.....	64

5.1.1. Az aortaokklúzió és a tourniquet okozta izom iszkémia összehasonlítása ...	64
5.1.1.1. Szöveti vizsgálatok	64
5.1.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok	64
5.1.1.4. Izomrost-életképesség vizsgálat	65
5.1.2. Korrosziós öntvények	65
5.2. II. Kísérlet: Az izomrost életképesség meghatározás vizsgálata	67
5.2.1. Mikrocirkuláció vizsgálata	67
5.2.2. Iszkémiás károsodás vizsgálata	68
5.2.2.1. Izomrost-életképesség vizsgálat	68
5.2.2.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok félvékony metszeteken	70
5.2.2.3. Elektronmikroszkópia	71
5.2.3. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás vizsgálata	73
5.2.3.1. Izomrost életképesség	73
5.2.3.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata	74
5.2.3.3. Elektronmikroszkópia	75
5.3. III. Kísérlet: A poszt kondicionálás vizsgálata	76
5.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálat	76
5.3.2. Izomrost életképesség	78
5.3.3. Elektronmikroszkópia	78
5.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok	79
5.3.5. Az izomszövet nedvességtartalma	80
5.3.6. Végtagi mikrocirkuláció	80

5.4. Klinikai vizsgálatok eredményei.....	81
5.4.1. Demográfiai és anamnesztikus adatok	81
5.4.2. Fénymikroszkópia	83
5.4.3. Életképesség vizsgálatok.....	86
5.4.4. Utánkövetés.....	87
6. MEGBESZÉLÉS.....	88
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	105
8. ÖSSZEFOGLALÁS	109
9. SUMMARY.....	110
10. IRODALOMJEGYZÉK	111
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	128
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	131

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A szövegben ismétlődő rövidítések abc sorrendben:

a.	artéria
ADP	adenozin-difoszfát
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
ARDS	adult respiratory distress syndrome
ATP	adenozin-trifoszfát
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
CK	kreatin-kináz
CK-MB	kreatin-kináz, szív eredetű izoforma
cNOS	konstitutív nitrogén monoxid szintáz
DNS	deoxiribonukleinsav
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
GOT	glutamát-oxálacetát transzamináz
GPT	glutamát-piruvát transzamináz
HE	hematoxillin-eozin
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α
I	iszkémia
ICAM-1	intracellular cell adhesion molecule-1
ISCVS	International Society for Cardiovascular Surgery
IFN- γ	interferon- γ
IL-	interleukin-
INR	international normalized ratio (of blood coagulation)
IR	iszkémia-reperfúzió
K ⁺ _{ATP}	ATP szenzitív K ⁺ csatorna
LDH	laktát-dehidrogenáz
m.	musculus
MODS	multiorgan dysfunction syndrome
MOF	multiple organ failure
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH-TR	NADH-tetrazólium reduktáz
NF- κ B	nukleáris faktor- κ b
NO	nitrogén monoxid
PC	poszt kondicionálás
PI-3-kináz	phosphoinositide-3-kinase
PKC- ϵ	protein-kináz C- ϵ
PMN	polimorfonukleáris
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SVS	Society for Vascular Surgery
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
TRIS	tris(hidroximetil)aminometán
VEGF	vascular endothelial growth factor

2. BEVEZETÉS

Az alsó végtagi akut artériás okklúzív betegségek nagy klinikai jelentőséggel bírnak gyakoriságuk és magas mortalitásuk okán. Az elzáródott artéria által ellátott szövetek iszkémiás károsodást szenvednek, a keringés beindítása azonban paradox módon további, reperfüziós károsodásokat okoz. Az okklúzió-revaszkularizáció során kialakuló sérülést így összefoglaló néven iszkémiás-reperfüziós (IR) károsodásnak nevezzük.

Hosszú idejű vértelenséget követő revaszkularizáció során az iszkémiás-reperfüziós károsodás súlyos szövődményekkel járhat, lokálisan a végtagi vázizomzat rabdomiolízisével, nekrozisával, illetve a mikrovaskulátúra károsodásával. Ezen felül a sérült izomtömegből lokálisan felszabaduló toxikus anyagszertermékek és gyulladásos mediátorok által indukáltan egy szisztémás generalizált gyulladásos válaszreakció veheti kezdetét, mely akár többszervi elégtelenségig is progrediálhat.

A kialakuló lokális és szisztémás válaszreakciók mértéke, illetve a többszervi elégtelenség létrejötte főként az iszkémiás-reperfüziós károsodás mértékének függvénye. Ennek okán a végtagi iszkémiás-reperfüziós károsodás súlyosságának objektív felmérése kiemelt fontosságú a megfelelő terápia megválasztása, így a kialakuló szövődmények minimalizálása céljából. Jelenleg azonban nem áll rendelkezésre módszer a károsodás kiterjedésének megállapítására, klinikai körülmények között csupán a károsodás mértékének megbecslése lehetséges, mely azonban kis hatásfokú.

A súlyos szövődmények kialakulásának megelőzésére egy másik lehetőség az iszkémiás-reperfüziós károsodás mérséklése. A poszt kondicionálás egy sebésztechnikai eljárás, mely képes lehet ezen cél elérésére, így a hosszú idejű végtagi artériás elzáródások szövődményeinek csökkentésére, mely javíthatja a mortalitást és a betegek életminőségét.

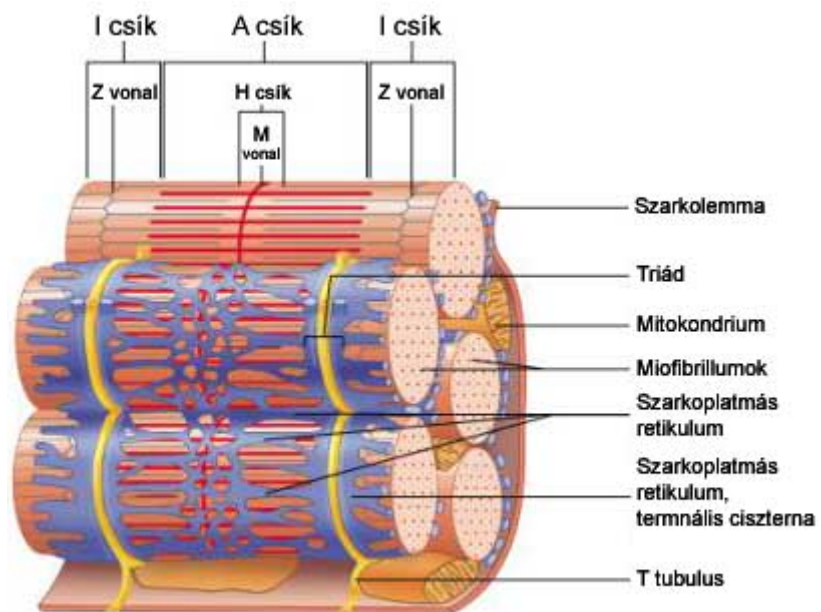
Jelen bevezetés célja a vázizomokban létrejövő iszkémiás-reperfüziós károsodások elméleti és klinikai hátterének bemutatása, a károsodás mértékét potenciálisan meghatározni képes módszerek alapjainak ismertetése, valamint a poszt kondicionálás izomszövetre vonatkozó hatásainak áttekintése. A dolgozatban terjedelmi korlátok miatt a dolgozat által felölelt témákhoz szorosan kapcsolódó háttér

ismertetésére szorítkozunk, ezen elemek leírásának jelentős része a múlt század középső részében keletkezett. A korszerű, molekuláris ismeretek bemutatására a fent részletezett okok miatt a dolgozatban ritkán szólnunk.

2.1. A vázizom felépítése

A vázizomszövet funkcionális egysége az izomrost (1. ábra). Az izomroston belül található a kontrakcióért felelős egységek a miofilamentumok. Két típusú filamentumot különítünk el, a vastag miozin és a vékony aktin filamentumot. Ezen filamentumok egymáson elcsúszva ATP hasítsa mellett képesek a kontrakcióra. A miofibrillumok az izomrostban megfelelő elrendezésben helyezkednek el, mely felelős a hosszanti metszetben megfigyelhető harántcsíkolatért. A harántcsíkolat sötétben festődő, vastag és vékony filamentumokat átfedésben tartalmazó sávjai polarizációs mikroszkópban vizsgálva kettősen törőek, anizotrópok (A-csík), míg a csak vékony filamentumokat tartalmazó világosan festődő csíkok a poláros fényt nem változtatják meg, izotrópok (I-csík). Az I-csík közepén megfigyelhető vékony, sötét vonal a Z-vonalként, mely a

vékony filamentumok kihorgonyzásának a helye. Az A-csík közepén egy világosabb sáv látható, melyet H-csíknak neveznek, ezen a terület csak vastag filamentumok találhatóak. A H-csíkot középen a sötét M-csík osztja ketté, mely a vastag filamentumok összekapcsolódásának



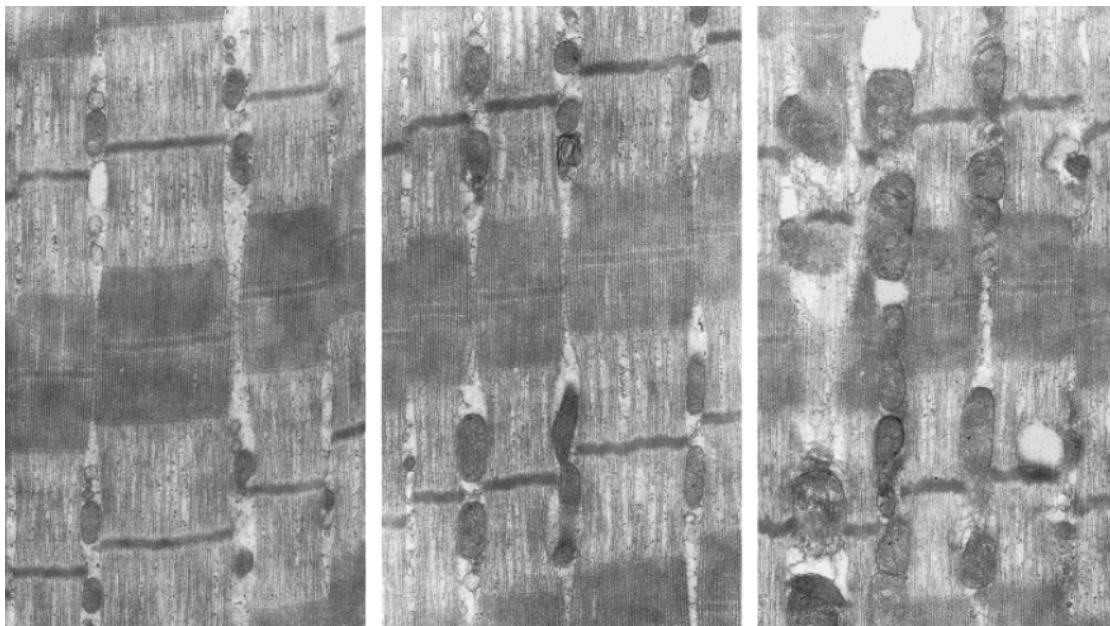
1. ábra: **A harántcsíkolat izom felépítése.**

Forrás: http://faculty.etsu.edu/forsman/Histology%20of%20musclefor%20web_files/image009.jpg.

helye. Az izomrost alapegysége a szarkomer, mely a miofibrillumok két Z-vonal közé eső része.

A megfelelően gyors kontrakció elérése miatt az izomszövet sejtmembránja (szarkolemma) a miofibrillumokra merőleges síkban, egészen a miofibrillumok közötti térbe csőszerűen betüremkedik, melyet T-tubulusok rendszerének nevezünk. Az izomszövet endoplazmatikus (szarkoplazmatikus) retikulum hálózata a T-tubulusokhoz két oldalról szorosan hozzáfekszik, úgynevezett triádokat alkotva. Az izomszövet ezen felül nagy energiaszükséglete miatt nagyszámú mitokondriumot tartalmaz (1. ábra).

Az izomrostok szerkezeti felépítése azonban nem egységes, morfológiai kritériumok alapján hagyományosan három különböző fajtáját különítjük el. Az úgynevezett I-es típusú izomrost mitokondriumokban gazdag, dús kapilláris hálózattal körülölelt típus, melyben az energiatermelés döntően oxidatív, aerob jellegű. A rostok ultrastruktúráját sok, nagyméretű mitokondrium, magasabb lipid- és alacsony glikogéntartalom jellemzi. Ezen izomrostok összehúzódása, lassabb, ugyanakkor tartós munkavégzésre képesek. A dús kapilláris hálózat miatt ezen rostok színe sötétebb, így más néven vörös izomrostként is ismertek. Ennek ellenpólusát az úgynevezett IIb típusú izomrostok képezik, melyek kapilláris hálózata szegényebb, főként anaerob anyagcserét folytatnak, a szükséges energia nagy részét glikolízis során nyerik. Ezen rostok gyorsan és nagy erővel képesek az összehúzódásra, azonban könnyen fáradnak.



2. ábra: **A különböző rosttípusok ultrastruktúrája.** Forrás: Okata T, Yamasaki Y. 1997.⁸

Jobbra: I-es típusú rost; Balra: IIb típusú rost; Középen: IIa típusú rost.

Ultrastrukturájukat a nagy glikogéntartalom, valamint a csekély mitokondrium-szám jellemzi. Világosabb színük miatt fehér izomrostként is ismertek. A két pólus között található a IIa típusú intermediér rostok, melyek világosabb színük okán fehér izomrostok közé sorolandók, azonban minden egyéb tekintetben a két korábban említett izomrost között helyezkednek el. A szükséges energiát mind aerob oxidáció, mind anaerob glikolízis során képesek megtermelni (2. ábra).

2.2. Iszkémiás-reperfúziós károsodása vázizomban

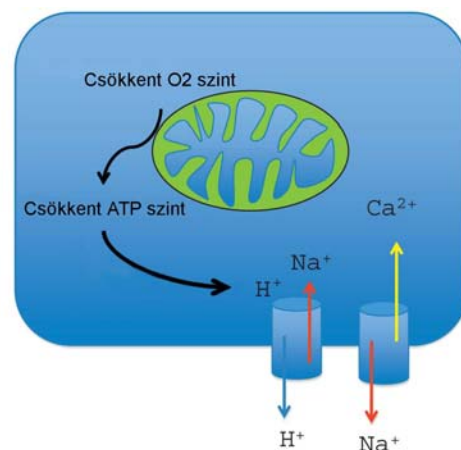
2.2.1. Iszkémiás károsodás

Iszkémiás károsodás az adott szervet, szövetet ellátó verőér elzáródásakor jelentkezik. Lényege a sejtszintű homeosztázis fenntartásához szükséges energia-szint csökkenése. A nagy energiájú foszfát-raktárak kiürülnek, károsodnak a membránfunkciók, az ioneloszlás és az enzimszisztemek zavarai végül sejthalálhoz vezetnek. A mikrocirkuláció és a sejtanyagcsere finoman szabályozott egyensúlya szintén meg bomlik.

A harántcsíkt izomszövet iszkémiás károsodásának mértékét elsősorban az iszkémia időtartama és a szövetre jellemző tolerancia-idő között fennálló viszony határozza meg.¹² Az iszkémiás tolerancia az a leghosszabb, vértelenségben eltöltött időtartam, melynek megszűnte után a szervi funkciók még visszatérnek (*restitutio ad integrum*).

Az alsó végtagi izomszövet iszkémiatűrésében meghatározó a sejtek ATP szintje, hiszen az iszkémiás izom-nekrózis fő kiváltója az ATP-szintek jelentős csökkenése.¹³

ATP hiányában a sejtmembrán ATP-dependens iontranszportereinek funkciócsökkenése következik be, mely az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnövekedéséhez vezet, ez pedig a foszfolipázok, kalmodulin által regulált



3. ábra: Az iszkémiás károsodás

Forrás: Kharbanda RK. 2010.⁶

proteázok és endonukleázok aktivációját indukálja.¹⁴ Azonban nemcsak az előbbi mechanizmus emeli meg a sejten belüli Ca^{2+} -tartalmat. A membránfunkció sérülése miatt a Na^+/K^+ -pumpa működése is károsodik, intracelluláris Na^+ - és vízbeáramlást, valamint K^+ -kiáramlást eredményezve, mely egyrészt a sejt duzzadását okozza, másrészt a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumpa ionáramlásának irányára hatva Ca^{2+} -beáramlást idéz elő (3. ábra).¹⁵

Az izomszövetben iszkémia hatására továbbá fokozódik az anaerob glikolízis, a glükóz-felvétel és a glikogén lebontás. A glikolízis során keletkező piruvátot a képződő NADH laktáttá redukálja. Mivel a szöveti perfúzió elégtelen, a laktát elszállítása nem történik meg, melynek következtében acidózis lép fel, amit a károsodott ionpumpa-funkció miatt fellépő magasabb H^+ -koncentráció és az anyagcsere folyamatok során képződő szén-dioxid tovább fokoz.¹⁶ Ezen felül a kialakuló acidózis a Na^+/H^+ -antiporter (az intracelluláris pH fő meghatározója) fokozott működéséhez vezet, így a Na^+ intracelluláris koncentrációja tovább nő, mely további intracelluláris Ca^{2+} -akkumulációt idéz elő.

A fenti mechanizmusok összessége a sejtek nekrozisát eredményezhetik.

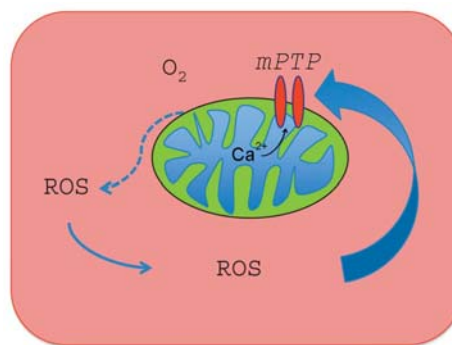
2.2.2. Reperfúziós károsodás

A reperfúzió során végbemenő folyamatok kezdeti stádiumában főként a reaktív szabadgyökök keletkezése dominál. Szabadgyökök leginkább az ATP bomlástermékeként keletkező hipoxantin további átalakítása során képződnek.¹⁷ Ennek oka, hogy a reperfúzió kezdetén a folyamatot fiziológiás körülmények között végző xantin-dehidrogenáz enzim hipoxia hatására xantin-oxidázzá alakul át.¹⁸ Az oxidációs folyamat melléktermékeként szuperoxid és hidrogén-peroxid gyökök keletkeznek. A reaktív oxigéngyökök képződéséhez hozzájárul továbbá az iszkémia során a mitokondriumban felhalmozódott nagy mennyiségű Ca^{2+} is.^{19, 20} A megnövekedett intramitokondriális Ca^{2+} -koncentráció hatására a mitokondrium membránjában elhelyezkedő elektrontranszportért felelős enzimek és molekulák (NAD, FAD, citokróm B, koenzim Q) redukciója következik be, mely rontja a légzési lánc hatásfokát, így további szabadgyök melléktermékek képződéséhez vezet.²¹

A keletkező szabadgyökök károsodásokat okoznak a membrán lipidekben, proteinekben, szénhidrátokban és nukleinsavakban. A reaktív gyökök a DNS (dezoxiribonukleinsav) molekulákban keresztkötéseket, nukleinsav-hasításokat és bázis-hidroxilációt indukálnak. Károsító hatással vannak a többszörösen telítetlen zsírsavakra, lipidperoxidációt hozva létre, melynek eredményeként zsírsav peroxil gyökök és lipid peroxidok képződnek. A lipidperoxidok hatására lipid-lipid, lipid-protein, protein-protein diszulfid-híd keresztkötések jönnek létre, valamint protein- és zsírsavhasadás alakul ki. A folyamat eredményeként a létfontosságú szubcelluláris enzimek, a kontraktilis apparátus sérülései jönnek létre, továbbá a sejtmembrán integritásának, valamint a mitokondrium-membrán energiatermelésének és iontranszport működésének károsodását okozzák.²²

A szabadgyökök aktiválják továbbá a redox-szenzitív transzkripciós faktorokat (pl. NFκB), ezzel indukálva a különböző gyulladásos mediátorok (IL-1β, TNF-α) felszabadulását, létrehozva első körben egy lokális gyulladásos reakciót az iszkémizált szövetben.²³

Az iszkémia során kialakuló intramitokondriális Ca^{2+} -többlet, valamint a folyamatosan növekvő oxidatív stressz együttesen a mitokondrium membránjában az ún. mPTP (mitochondrial permeability transition pore) nevű óriáscsatorna megnyílásához vezet (4. ábra⁶).²⁴ A csatorna megnyílása felborítja a mitokondriális belső membrán szigorúan szabályozott szelektív permeabilitását, mely a mitokondriális mátrix



4. ábra: **A reperfüziós károsodás**

Forrás: Kharbanda RK. 2010.⁶

duzzadásához vezet, a proton gradiens megszűnik, az oxidatív foszforiláció szétkapcsolódik, végül az organellum dezintegrációját idézi elő.²⁴ Ennek következményeként az iszkémia során már jelentősen károsodott ATP ellátás tovább romlik.

Ezen óriáscsatornán keresztül továbbá belső membrán proteinek kerülhetnek ki a citoszólba (citokróm c, illetve a Bcl-2 család tagjai), melyek a sejt pusztulását indíthatják el.²⁵ Az mPTP csatorna megnyílása tehát kulcstényező a sejtnekrózishoz vezető úton.

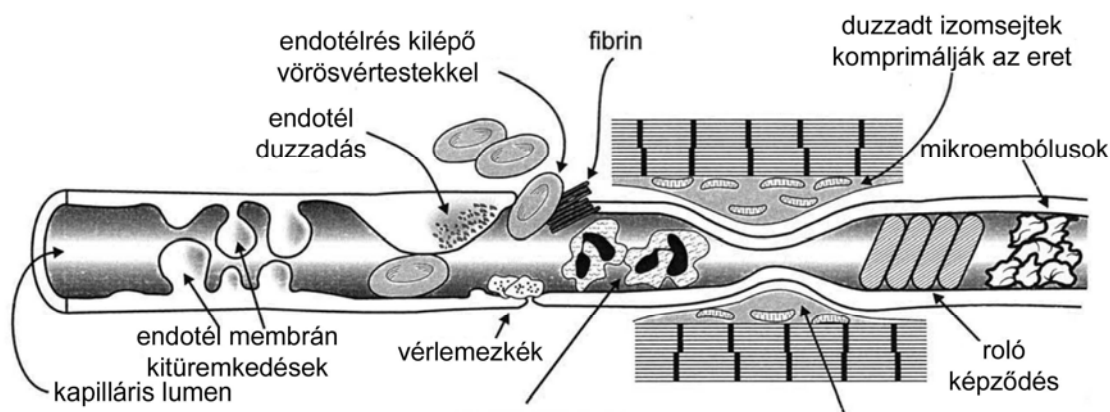
2.2.3. Mikrocirkulációs változások - gyulladásos reakció

A lokális károsodások részeként az izomsejtek károsodása mellett az endotél sejtek is sérülhetnek az iszkémiás-reperfúziós károsodás során. Ezeknek a sejteknek a sebezhetősége igen kifejezett mind az iszkémia, mind a reoxigenizáció alatt.

Prolongált oxigénhiány során membránpotenciál-változás, ioneloszlási zavar alakulhat ki az endotél sejtekben, mely a sejtek duzzadásához, a sejtmembrán csökkent áteresztő képességéhez, valamint a citoskeletális rendszer károsodásához vezet, ezt endotél diszfunkciónak említi az irodalom (5. ábra).²⁶ Ezen elváltozásoknak velejárója az energiaraktárak kiürülése (a folyamat megegyezik az izomszövetnél leírtakkal), egyes bioaktív ágensek csökkent képződése (prosztaciklin, NO), míg más mediátorok (endotelin, thromboxán A2) fokozott elválasztása.²⁷ Az előbbiekhöz hasonlóan számos gén átíródása felgyorsul (adhéziós molekulák, citokinek), vagy szuppresszálódik (cNOS, thrombomodulin).²⁸

A fenti szubcelluláris változások következtében a sejtek membránján a lumen felé ujjszerű kitüremkedések, a citoplasma felé pedig invaginációk jelennek meg. A vértelenség előrehaladtával az endotél sejtek közötti összeköttetések felszakadnak, extrém széles réseket hozva létre a kapillárisok falán. Progrediáló endoteliális ödéma alakul ki, amely azonban nem egységes, duzzadt és normális nagyságú sejtek váltakoznak egymás mellett.²⁹

A keringés újraindulásával a fent említett változások következtében a kapilláris lument kitapadt aktivált leukociták, levált endotél sejtek és vörösvértestek zárhatják el.³⁰ A sejt elemek megjelenésével párhuzamosan megnövekszik az érpermeabilitás, a



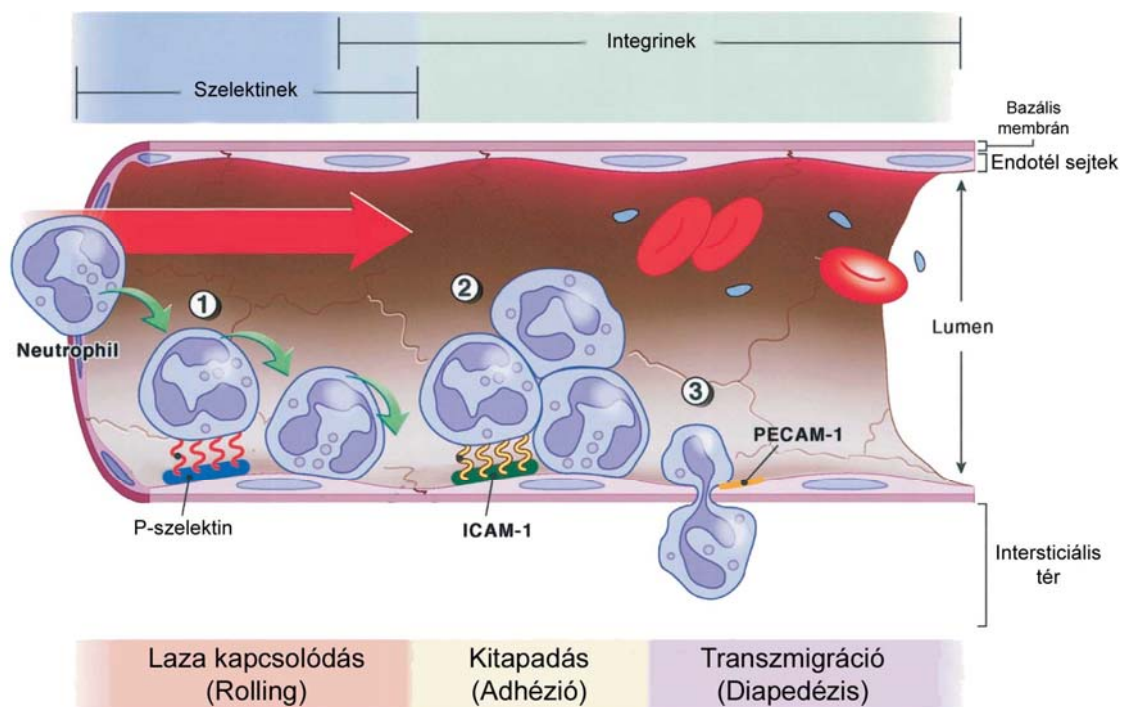
5. ábra: A mikrovaskulátúra károsodása iszkémia-reperfúzió során

Forrás: Reffellmann T, Kloner RA. 2002.⁷

plazmaproteinek extravazális kilépése következtében fokozódó intersticiális ödéma alakul ki, mely a mikrovaszkulátúra komprimációját okozhatja. A reperfüzió alatt az arteriolák endotélsejtjeiben elégtelenné válik a NO termelése, így a sejtek endogén vazodilatátorok (acetilkolin) iránti válaszkészsége elvész, mely a vaszkuláris simaizom-elemek elernyedési képtelenségét okozza.

A fent említett folyamatok - mint endotél duzzadás, fokozott kapilláris permeabilitás, intersticiális ödéma, a lumenelzáródást okozó sejt-es elemek és a simaizom sejtek elernyedési képtelensége - eredményeként jön létre az ún. „no-reflow” jelenség, mely az keringés beindulását az adott területen nem teszi lehetővé, az iszkémiát prolongálhatja, a reperfüzió mintázatát „foltossá” teszi ezáltal.³¹

A reperfüzió során a megváltozik az endotél sejtek felszíne, bizonyos adhézios molekulák (ICAM-1, E-szelektin, P-szelektin) fokozott expressziója figyelhető meg, mely hozzájárul a gyulladásos folyamatok kialakulásához.³² A megváltozott sejt-felszíni molekulák hozzájárulnak a gyulladásos sejtek érfalhoz való adhéziojához, transzendotelialis migrációjához, így a gyulladásos sejtek lokális akkumulációjához (6. ábra). A gyulladás kialakulásában szerepe van még az elhalt sejtekből kiszabaduló intracitoplazmatikus komponenseknek, a lokálisan szintetizálódó citokineknek (TNF- α , IL-6) és az intersticiális területen lévő aktiválódó hízósejteknek, makrofágoknak.³³ A



6. ábra: Leukocita-endotél interakciók

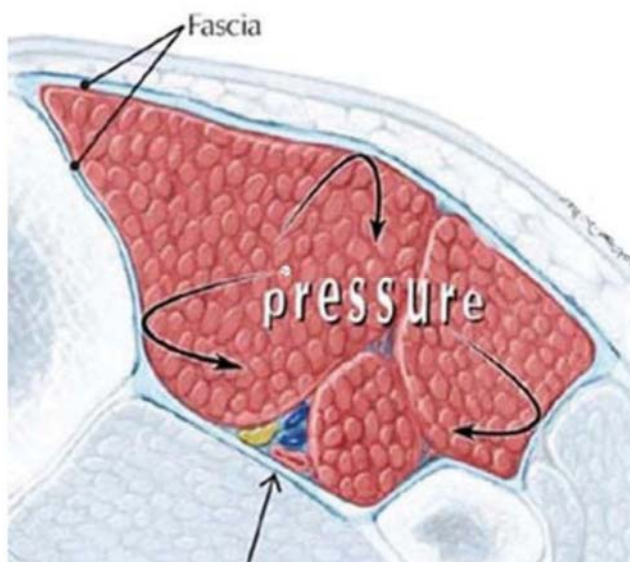
Forrás: Collard CD et al. 2001.⁵

gyulladásos sejtek jelenléte fokozott reaktív szabad gyök felszabadulással jár, mely tovább fokozhatja a reperfúziós károsodás mértékét.³⁴

2.2.4. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás lokális szövődményei

A károsodás lokális szövődményei az izomsejt sérülésből, a megváltozott mikrokeringésből és a lokális gyulladásból tevődnek össze. A fent részletezett folyamatok következtében az izomsejtek dezintegrációja (rabdomiolízis), nekrózisa következik be, melyet az endotél károsodás következtében kialakuló gyulladásos folyamat tovább erősít.

A reperfúzió alatt az endotél sejtek átteresztőképességének megváltozása következtében extravazáció jön létre. Az alsó végtagon a fasciarekeszek zártsága miatt a kialakuló szöveti ödéma és a sejtek intracelluláris duzzadása egy speciális helyzethez vezet, mely sokkal súlyosabb sérülést okoz egy fasciarekeszekbe nem szorított iszkémiás-reperfúziós modellhez képest (pl máj, vese). A szöveti ödéma és a sejtek duzzadása a zárt fasciarekeszben az intrakompartmentális nyomás



7. ábra: Az intrakompartmentális nyomás növekedése zárt fasciarekeszben

Az intra- és extracelluláris ödéma mértékének fokozódása a nyomás növekedéséhez, ezáltal a nutritív nagy- és kiserek kompressziójához vezet, mely a szöveti hipoxia fennállását prolongálja. Forrás: Wiegand et al. 2009.³ Ezen jelenség a szöveti hipoxia hosszabb idejű fennmaradását okozza.³⁵ Ezen folyamat a klinikai megfelelője az ún. rekesz (kompartment)-szindróma.³⁶

Az izomszövet súlyos károsodása során a széteső izomrostokból nagy koncentrációban kerülhetnek továbbá a keringésbe toxikus, intracelluláris komponensek

(például myoglobin és különféle ionok, főként Ca^{2+} és K^+), mely hozzájárulhat egy szisztémás gyulladás kifejlődéséhez.³⁷

2.2.5. Szisztémás szövődmények

A helyi gyulladás generalizálódása révén egy szisztémás gyulladásos válaszreakció alakul ki (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), mely túlzott mértékű kiváltó tényezők mellett kontrollját veszítette válhat. A lokális gyulladásos folyamat generalizálódását különböző mediátorok produkciója (pro-inflammatórikus citokinek, komplement, akut fázis fehérjék, véralvadási kaszkád, neuroendokrin mediátorok), valamint gyulladásos sejtek lokális akkumulációja segíti elő. A folyamat progressziójában vélhetően a pro-inflammatórikus citokinek szerepe a legfontosabb, melyek lokálisan szabadulnak fel, két részletben: (1) akut szak során: $\text{TNF-}\alpha$ és az $\text{IL-1}\beta$ megjelenése 1-2 órával a lokális károsodás kezdete után, valamint (2) szubakut szakban, melyet főleg IL-6 , IL-8 , IL-12 , IL-18 és $\text{IFN-}\gamma$ felszaporodása jellemez.³⁸ A legfontosabb mediátorok ezen belül is a $\text{TNF-}\alpha$, az $\text{IL-1}\beta$ és az IL-6 .³⁹

Ezen fenti, szolúbilis, nem antigén specifikus fehérjék a szisztémás gyulladás mediálásában több szinten is részt vesznek. (1) elősegítik a gyulladásos sejtek aktivációját és kitapadását a távoli szervekben, (2) akut vaszkuláris károsodást idéznek elő az érpallya egész területén, (3) szisztémásan fokozzák az erek permeabilitását.⁴⁰

A szisztémás gyulladás progressziójával a távol eső szervekben is károsodások alakulhatnak ki a szívben, tüdőben, vesékben, gasztrointesztinális és központi idegrendszerekben,⁴¹ a folyamat végeredménye akár többszervi károsodás (multiorgan dysfunction syndrome, MODS), illetve elégtelenség (multiple organ failure, MOF) is lehet (8. ábra).



8. ábra: **A többszervi elégtelenség**

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás következtében kialakuló szisztémás gyulladás a tüdő, a vesék, a szív, a máj, a pancreas, a központi idegrendszer, az endocrin szervek, valamint a vérképző rendszer károsodását okozhatja. Ezen szervek, szervrendszerek sérülése a szisztémás gyulladás mértékét fokozhatja, mely nagyobb mértékű szervkárosodásokhoz vezethet. Forrás: Proudfoot AG et al. 2011.¹¹

A keringő citokinek hatására szívelégtelenség léphet fel, ami részben a mediátorok direkt hatása,⁴² részben a megnövekedett szabadgyök felszabadulás következménye: a megnövekedett szabadgyök-szint ugyanis befolyásolja a szívműködés adrenerg és kolinerg ingerekre adott válaszát.⁴³ A szív csökkent funkciója hipotenzióhoz, így a szervek csökkent perfúziójához vezethet.

A csökkent perfúzió a gasztrointesztinális traktus iszkémiáját okozhatja, melyre az kifejezetten érzékeny. Az iszkémiás károsodás a mukóza permeabilitásának növekedéséhez, bakteriális transzlokációhoz vezet.⁴⁴ A portális vérben baktériumok és bakteriális endotoxin jelenik meg, melyek a májba jutva aktiválják a Kupffer-sejteket.

Az aktivált Kupffer-sejtek citokineket (főként TNF- α -t) termelnek,⁴⁵ tovább növelve a véráramban jelenlévő citokinek koncentrációját. Az endotoxin bekerülhet a szisztémás keringésbe is, ahol toxikus károsodásokat okozhat, valamint makrofágokat aktiválhat. Mindkét folyamat hozzájárul a generalizált gyulladás további progressziójához, ezáltal a többszervi elégtelenség kifejlődéséhez.

A tüdőben a perikapilláris gyulladás és a következményes transzszudáció már korán diffúziós akadályt képez a gázcseré útjában, emiatt légzési distressz alakul ki (adult respiratory distress syndrome, ARDS), mely igen gyors klinikai állapotromláshoz vezethet.⁴⁶

Az iszkémizált szövetek revaszkularizációja, különösen, ha a végtagi nagy tömegű izomról van szó, metabolikus acidózissal, hiperkalémiával és mioglobinémiával jár, mindez mioglobininúriához, akut tubuláris nekrozishoz, akár veseelégtelenséghez is vezethet.⁴⁷ A perioperatív vesediszfunkció kialakulásának mechanizmusa több komponensű: köthető a szövődményként megjelenő keringési elégtelenséghez,⁴⁸ nefrotoxikus anyagok felszabadulásához,⁴⁹ neuroendokrin mechanizmusokhoz, vagy a gyulladásos mediátorok direkt károsító hatásához.⁵⁰

2.3. Az akut verőér-elzáródás klinikai megjelenése

A végtagi artériás okklúzív betegségek gyakori előfordulásuk (incidencia 15/100.000 lakos⁵¹) és komoly szövődményeik miatt nagy klinikai jelentőséggel bírnak.⁵² A késői felismerés és beavatkozás következményei a végtag elvesztésével, vagy akár a beteg halálával is végződhetnek.

A végtagot ellátó artéria hirtelen történő elzáródása következtében akut iszkémia jön létre, mely a mai napig is magas mortalitással és szövődményrátaival rendelkezik. Az alsó végtagi iszkémia mortalitása napjainkban is elérheti a 20-30%-ot,⁵³ továbbá az esetek 20-40%-ában az érintett végtag megtartása sem lehetséges.⁵⁴ Prevalenciája az elmúlt 30 évben folyamatosan növekedett, hasonlóan a többi okklúzív verőérbetegségéhez, ami valószínűleg a növekvő várható élettartammal, a rizikófaktorok számító betegségek (hipertónia, diabetes mellitus) gyakoriságának növekedésével, illetve a nem megfelelő életmóddal (a dohányzók nagyobb számával és a fizikai aktivitás csökkenésével) magyarázható.⁵⁵

2.3.1. Az alsó végtag iszkémiás károsodását befolyásoló tényezők

A klinikai kimenetel szempontjából az egyik legfontosabb, iszkémiás reperfüziós károsodás mértékét befolyásoló, tényező az iszkémia időtartama.¹² A regeneráció alapjául szolgáló sejtek csak akkor maradhatnak életképesek, ha az iszkémia ideje a végtag iszkémia toleranciáját nem haladja meg. Az emberi alsó végtagon 1-2,5 órás hosszúságú iszkémiát (amit a rekonstrukatív érműtétek során az aorta kirekesztése, vagy ortopédiai térdműtét esetén az külső kompresszió nyújtotta megterhelés jelent az esetek legnagyobb részében) követően a kialakuló elváltozások még reverzibilisek, a biokémiai paraméterek rendeződése a reperfüzió kezdetét követően hamar várható.⁵⁶

Hosszabb ideig fennálló artériás iszkémia azonban súlyos elváltozásokat hoz létre az izomban, kifejezetten hosszú iszkémiás időszakot követően akár visszafordíthatatlan károsodások is létrejöhetnek, melyek a szövődmények előfordulásának valószínűségét jelentősen megnövelik.

Az iszkémia toleranciát befolyásoló egyéb egészségügyi tényezők közül megemlítendő a korábbi végtagfájdalom jelenléte (dysbasia), a krónikus szívbetegség, hipertenzió, a diabetes mellitus, a hiperlipidémia, a hiperkoleszterinémia, illetve a dohányzás.

2.3.2. Diagnózis

A mindennapi gyakorlatban a diagnózis egyszerűen felállítható a meglévő klinikai tünetek alapján (6P: végtagi fájdalom, pulzustalanság, sápadtság, hűvösség, paresztézia, paralízis, poikilothermia). A nehézséget azonban nem a diagnózis felállítása, hanem a súlyosság megítélése jelenti. A végtag megtarthatóságának megállapítása nehéz feladat, jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan klinikai jelek és/vagy laboratóriumi paraméterek, melyek alapján súlyos, hosszantartó iszkémiás esetben a végtag károsodása objektíven megállapíthatóvá válna.

Egy rosszul meghozott döntés nemcsak a végtag túlélését veszélyezteti, hanem a beteg életét is veszélybe sodorhatja: az irreverzibilisen károsodott végtag esetén a revaszkularizáció kedvező hatásokkal nem jár; a súlyos, fatális szövődmények kialakulási valószínűségét növeli csupán. A csak szubjektív döntési séma alapján, óvatosságból rosszul meghozott döntés másik eredménye lehet egy valójában még megmenthető végtag amputációja, mely a későbbiekben jelentősen kihat a beteg életminőségére.

Az objektívebb döntés elősegítésére létezik egy kritériumrendszer, (1. táblázat), az ún. SVS/ISCVS (Society for Vascular Surgery / International Society for Cardiovascular Surgery) rendszer, melyet Rutherford és munkatársai fogalmaztak meg.^{57, 58} A kritériumok hatékonyan alkalmazhatóak az enyhébb iszkémiás károsodások esetén, azonban súlyos, hosszan tartó iszkémia kapcsán a rendszer korlátokba ütközik.

1. táblázat: **Az SVS/ISCVS kritériumrendszer**

Stádium	Leírás/Prognózis	Fizikai jelek		Doppler jelek	
		Szenzoros kiesés	Izomgyengeség	Artériás	Vénás
I. Életképes	Nem szükséges azonnali beavatkozás	Nincs	Nincs	Hallható	Hallható
II. Veszélyeztetett					
a. Kevésbé sürgős	Gyors kezeléssel megmenthető	Minimális (lábujjakon), vagy nincs	Nincs	Nem hallható	Hallható
b. Sürgős	Azonnali kezeléssel megmenthető	Nem csak a lábujjakon, nyugalmi fájdalommal asszociált	Enyhe, közepes	Nem hallható	Hallható
III. Irreverzibilis	Nagy szövetvesztés, vagy tartós idegsérülés elkerülhetetlen	Kifejezett, fájdalomcsillapító adása szükséges	Kifejezett paralízis (rigor)	Nem hallható	Nem hallható

2.3.3. Revaszkularizációs kezelés

Az akut végtagi iszkémia kezelésében súlyosságtól függően revaszkularizáció, vagy amputáció a választandó eljárás. A verőér lumenének felszabadítása megoldható sebészeti, vagy trombolitikus kezeléssel.

A trombolitikus kezelés használata enyhébb esetekben (SVS/ISCVS I és IIa stádium) ajánlott, főként az intraarteriális, katéter vezérelt módszer alkalmazandó a nagy specificitás és távoli szövődmények elkerülése érdekében.⁵² Előnye, hogy

angiográfiához kötötten a diagnosztikával egy ülésben elvégezhető, alkalmazásával kisebb mértékű az endotél-sérülés, valamint olyan kis átmérőjű erek lumenének szabaddá tételére is alkalmazható, melyek a sebészeti eljárás ballonkatéterét már nem képesek befogadni.

A sebészi beavatkozás indikációját főként a hosszú iszkémiás idejű (SVS/ISCVS IIb stádium), illetve a rövid iszkémiás idejű, de kifejezett szenzoros és motoros deficittel járó elzáródások jelentik. Súlyos esetben, mikor a késlekedés nem megengedhető, szintén a sebészeti megoldást kell választani.⁵²

Amputáció primeren az SVS/ISCVS III. stádium esetében jön szóba. Szekunder amputációra is sor kerülhet a revaszkularizációt követően, ha a kialakuló szövődmények ezt szükségessé teszik. Amputációra az esetek kb. 25%-ban van szükség, melynek 40%-a primer, és 60%-a szekunder amputáció.⁵²

A kialakult szövődmények nem operatív kezeléséről a terjedelmi kíváncsagságuk szűkössége, valamint a dolgozat témájához való laza kapcsolódása okán a továbbiakban nem térünk ki.

2.3.4. Kórlefolyás

A hosszantartó iszkémiát követő revaszkularizáció tehát súlyos, életveszélyes állapotot idézhet elő. Ezért rekanalizációra abban az esetben érdemes törekedni, ha az a végtag megmenthetőségének reális esélye áll fent. Amennyiben izomkárosodás súlyossága olyan fokú, hogy a revaszkularizáció a végtag túlélését már nem képes biztosítani a végtag amputációja lehet csak terápiás értékű. A főként nem megfelelő kezelési stratégia megválasztásának következtében kialakuló súlyos szövődmények kezelése nehéz feladat, hiszen egy az egész szervezetet érintő rapid lefolyású entitással van dolgunk. A több szervi elégtelenség terápiájával kapcsolatban az eddigi próbálkozások, mint a citokinek mennyiségének csökkentése, proteáz inhibitorok, antioxidánsok alkalmazása, egyelőre nem bizonyultak eredményesnek.⁵⁹ Az iszkémiás károsodás mértékének pontos meghatározása tehát elengedhetetlen a szövődmények megelőzése érdekében.

2.4. Az iszkémiás károsodás mértékének megítélése

Az iszkémia következtében kialakuló izomkárosodás mértékének gyors és pontos megállapítása tehát a fent leírtak tekintetében kiemelt jelentőségű. A jelenleg rendelkezésre álló módszerek közül azonban csak kevés rendelkezik ezzel a potenciállal.

2.4.1 Az izomkárosodás mértékének megállapítására alkalmas módszerek

Az izomkárosodás mértékének megállapítására számos morfológiai és funkcionális, kvalitatív és kvantitatív eljárás áll rendelkezésre. Ilyenek módszerek a fény-⁶⁰ és elektronmikroszkópos változások detektálása,⁶¹ ezek szemikvantitatív kiértékelése különböző score rendszerek segítségével,⁶² a sejtek energiaháztartásának,¹³ illetve sav-bázis egyensúlyának vizsgálata,⁶³ redox-homeosztázis értékelése,⁶⁴ kapilláris permeabilitás vizsgálata,⁶⁵ kontraktilitást megítélő próbák,⁶⁶ illetve a mitokondriumok funkcióképességét megítélő technikák.⁶⁷

A fent említett eljárások jelentős része azonban az iszkémia ideje alatt nem alkalmazható a károsodás mértékének megítélésére, hiszen a vizsgált paraméterek jelentős része csak a reperfúzió során válik detektálhatóvá, mely a szisztémás szövődmények prevenciója szempontjából nem megfelelő.

Az iszkémia okozta izomkárosodás megítélésére azok a módszerek optimálisak, melyek a sejtek energiaháztartását vizsgálják, hiszen ahogy már a korábbi fejezetekben említettük az energiaraktárak kimerülése sejthalál egyik legfontosabb kiváltó tényezője.¹³ Megfelelően magas koncentrációjú ATP jelenléte a revaszkularizáció során elengedhetetlen a sejtek túlélése szempontjából, ennek hiányában a sejten belüli restitúciós folyamatok működésképtelenné válnak, sejthalál következik be. Szívizomsejteken végzett vizsgálatok szerint a sejten belüli ATP koncentráció csökkenése jól jelzi károsodás mértékét, továbbá egy 80-90%-os ATP-szint csökkenés sejtnekrózishoz vezet.⁶⁸

A sejtek ATP koncentrációjának biokémiai meghatározása a humán klinikai gyakorlatban azonban nem alkalmazható eljárás, a folyamat időigényes voltára való

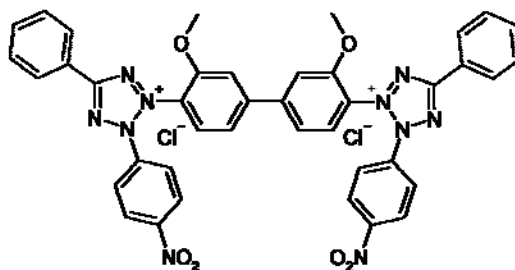
tekintettel. Az energiahordozók koncentrációjának direkt meghatározása mellett, illetve helyett éppen ezért a celluláris energia-szint indirekt vizsgálatára alkalmas eljárások jelenthetik az igazi megoldást.

2.4.2. A sejtek energiaszintjének indirekt meghatározása

A mitokondriumok, mint a sejtek energiatermelő egységei, az ATP szintéziséért felelősek, károsodásuk esetén nem keletkezhet elégséges mennyiségű ATP, így a sejtek túlélése sem biztosítható.⁶⁹ Iszkémia során a mitokondriális légzési lánc aktivitása csökken, mely aktivitás-csökkenés enzim-kémiai módszerek segítségével rövid idő alatt kimutatható, hiszen az alkalmazható reakciók gyors lefolyásúak.

Az enzim-kémiai reakciók alapját a különböző tetrazolium sók alkalmazása képezi. Ezen sók a terminális oxidáció enzimeinek működését képesek kimutatni, a megfelelő szubsztrát adagolásával. A működő enzim-komplexek a tetrazolium sókat redukálják, ezzel színes reakciótermék (formazán) keletkezik.⁷⁰ A sejtpartikulumok károsodása, lízise esetén a belső membránban helyet foglaló oxidációs enzim-komplexek működése megszűnik, így nem képesek a tetrazolium sók hasítására, tehát a festődés elmaradása a mitokondriumok károsodását jelzi.⁷¹ A tetrazolium sókkal történő makroszkópos festődés megszűnése jól korrelál a nekrozis jelenlétével.¹⁰

Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a tetrazolium sók átalakulása nem teljesen mitokondrium specifikus. Kis mennyiségben ugyan, de az endoplazmatikus retikulumban is képződhet színes reakció termék, valamint a keletkezett színes formazán lipidoldékony, így lipidekben gazdag szövet esetében (pl. zsíros degeneráció esetén) kisebb-nagyobb mennyiségű álpozitivitással számolni kell.⁷⁰



9. ábra: A nitroblue tetrazolium

Számos tetrazolium vegyület létezik, melyek közül a legspecifikusabb (alacsony redox potenciál és lipidoldékonyság), tehát a legalkalmasabb az iszkémiás károsodás

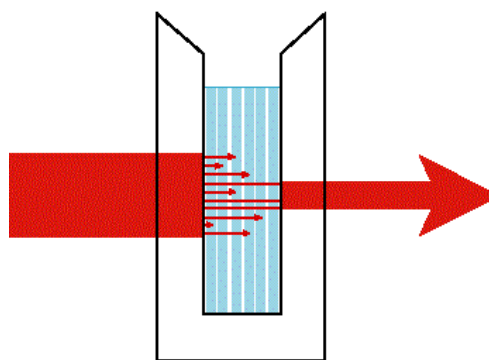
mértékének meghatározására a 2,2p-di-p-nitrofenil-5,5r-difenil-3,3t-(3,3'dimetoxi-4,4'-bifenilén)ditetrazolium-diklorid az ún. „nitroblue tetrazolium” (9. ábra).⁷⁰

Ahhoz azonban, hogy a reakció a klinikai gyakorlatban elismert módszerként hasznosíthatóvá váljék, a keletkezett reakciótermék mennyiségét valamilyen kvantitatív technika segítségével számszerűsíteni is szükséges.

2.4.3. Kvantitatív módszerek

A tetrazolium reakciók számszerűsítésére különböző technikák léteznek, melyek ugyan jelen formájukban a klinikai alkalmazásra nem alkalmasak, azonban megfelelő alapot jelenthetnek egy új technika kifejlesztéséhez.

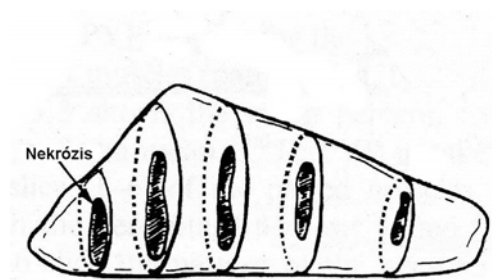
Az irodalomban ismert egyik ilyen módszer az tetrazólium redukció mértékének spektrofotometriás meghatározása.⁷² A reakció során keletkező formazán egy megadott hullámhosszon mutat abszorbancia maximumot (a nitroblue-tetrazólium esetében ez 585 nm⁷³), így a termék koncentrációja egy kalibrációs egyenes segítségével a kapott abszorbancia értékből meghatározható, kvantitatív eredményt biztosítva (10. ábra). A keletkezett reakciótermék koncentrációjának csökkenése a károsodás mértékét jól jelzi.⁷⁴ A módszer klinikai alkalmazhatóságát nehezíti, hogy az eljárás mindeddig kizárólag revaszkularizációt követően került kipróbálásra. Egy másik limitáló tényező az előkészítési idő, sajnálatos módon az eljárás minta-preparációs ideje jelenleg jóval hosszabb a klinikailag elfogadhatónál.



10. ábra: Az abszorbancia vizsgálata

A vizsgálat során az oldatot meghatározott (a vizsgálni kívánt oldott anyag tulajdonságától függő) hullámhosszú fénnel világítjuk meg, melynek egy részét az oldott anyag koncentrációfüggően elnyeli. A fény intenzitásából (a kezdeti intenzitás ismeretének függvényében) az oldott anyag koncentrációja kiszámolható. Forrás: <http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absflr.html>

Egy másik kvantifikációs módszer a szívizomszövetben is gyakran alkalmazott ún. planimetria.⁷⁵ A technika lényege: az izmot, vagy annak egy megfelelő méretű darabját tetrazólium söt tartalmazó festékbe mártjuk, a szövet a festéket diffúzióval felveszi, majd a mitokondriumok a tetrazólium söt átalakítják, mely makroszkóposan láthatóvá válik, az izom elszíneződik. A károsodott területek a fent részletezett okok következtében a tetrazólium reakció kivitelezésére képtelenek, így ezen



11. ábra: A planimetriás vizsgálat

A vizsgálat során az izomszövetet tetrazólium söt tartalmazó oldatba merítjük. Az életképe területek felveszik a söt (fehér sáv), míg a halott területek erre nem képesek (fekete sáv). A planimetriás életképesség a a viabilis területek az egész izomrost területéhez való viszonyítással adható meg.

Forrás: Labbe R et al. 1988.¹⁰

területek nem mutatnak színreakciót. A mintán ezek után meghatározásra kerül a reakciót nem mutató régiók aránya, a minta teljes területéhez képest (11. ábra). Ezen technika nagy előnye a gyorsaság, a vizsgálat már a klinikai gyakorlat számára is elfogadható időn belül kivitelezhető. A módszer hátránya viszont, hogy a megfelelő szenzitivitás eléréséhez nagy mennyiségű szövetmintára van szükség, ami a klinikai gyakorlatban elfogadhatatlan.

Ugyan az ismertett módszerek a betegágy melletti diagnosztikához jelen formájukban nem alkalmasak, mindkét technika esetében bebizonyosodott, hogy az általuk nyert eredmények jól korrelálnak az ultrastrukturális változásokkal.⁷¹ Egy ezen eljárásokon alapuló, megfelelő kvantifikációs technika kifejlesztése azonban megoldást hozhat az izomkárosodás mértékének klinikai gyakorlatban is megvalósítható meghatározására.

2.5. Kísérletes modellek a végtagi iszkémia vizsgálatára

A megfelelő klinikai gyakorlatba átültethető eredmények biztosítására a megfelelő állatmodell megválasztása kiemelt jelentőségű. Az izomszövet iszkémiás károsodásának vizsgálatára alkalmazott modellek alapvetően két csoportra oszthatók: (1) teljes iszkémiát létrehozó modellek, illetve (2) olyan kísérleti elrendezések, melyek során az iszkémia nem teljes, bizonyos mértékű reziduális perfúzió jelen van. Jelen

alfejezetben részletezzük az egyes modellek által biztosított előnyöket és hátrányokat, előrevetítvén kísérletes modellválasztásunk fő szempontjait.

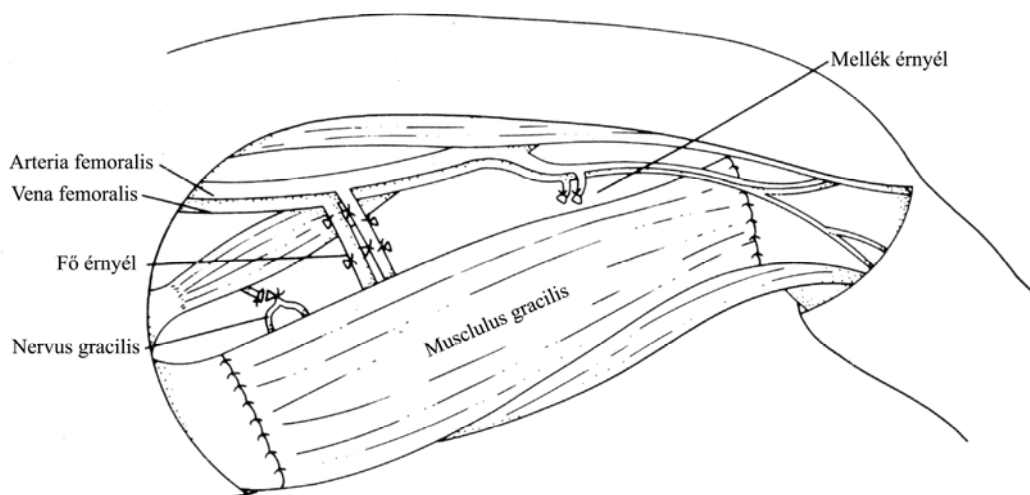
2.5.1. Teljes iszkémiát létrehozó modellek

Az iszkémia fokának pontos ismerete kiemelkedő jelentőségű a károsodás következtében létrejövő folyamatok feltérképezéséhez. Ennek okán jöttek létre a különböző teljes iszkémiát alkalmazó modellek, melyeknél reziduális perfúzió nincs jelen. A reziduális perfúzió kiiktatásával a kísérlet kiválóan standardizálható, hiszen az iszkémia súlyossága azonos külső feltételek mellett biztosan azonos lesz egyforma iszkémiás idők alkalmazásakor.

Többféle modell áll rendelkezésre az irodalomban, melyek a teljes izom iszkémia létrehozását célozzák meg:

2.5.1.1. Izolált kutya gracilis modell

A modellt Kuzon és munkatársai dolgozták ki 1986-ban (12. ábra).⁷⁶ Az előkészítés során a m. gracilist mind az eredésénél, mind a tapadásánál elvágásra kerül,



12. ábra: Az izolált gracilis modell

A modell során a kutya m. gracilis izmát mind az eredésénél, mind a tapadásánál elvágják, majd a helyére anatómiai pozícióba visszavarrják. Ezen felül a m. gracilist ellátó főartérián kívül az összes kollaterális eret megszüntetik. Forrás: Blebea J et al. 1987.⁴

melynek célja, hogy a az izom eredésénél a csontból érkező kollaterálisok befolyásoló hatása megszűnjön. Ezt az izmot ellátó érkepletek kipreparálása követi, majd az izmot ellátó mellék-érkepletek lekötése történik meg, így az izom vérellátását kizárólag a főartéria biztosítja. Az előkészítés végén az izom az eredeti helyzetébe visszavarrásra kerül, így elkerülhetővé válik az rosthossz változásából adódó, kísérletet befolyásoló hatás. A modell a 1980-90-es években széleskörűen elterjedt volt, jelenleg kevésbé használatos. Nagy jelentőségű felfedezések születtek alkalmazásával az iszkémiát elszenvedett izom energiaháztartásával,^{13, 76-79} szövettani károsodás mértékével,^{4, 10, 65, 77, 79, 80} lokális sav-bázis egyensúlyával,⁸⁰ szérumbiomarkerekkel,⁷⁷ valamint ultrastrukturális eltéréseivel^{10, 13} kapcsolatban.

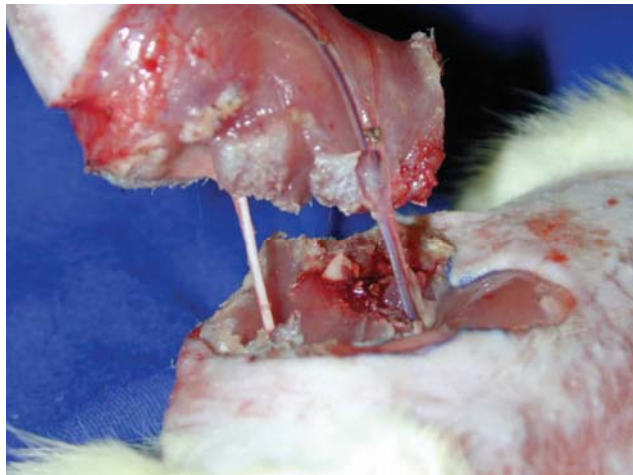
A modellnek léteznek patkányra adaptált változatai is, melyek használata főként a 2000-es években került előtérbe.^{30, 81} Ezen kis rágcsálókat alkalmazó modellek már nemcsak a m. gracilis, hanem a m. quadriceps,⁸² illetve a m. rectus femoris⁷⁵ izolálását is alkalmazzák.

2.5.1.2. Amputációs modellek

Nem túl gyakran alkalmazott technikák összefoglaló neve, melyek a teljes iszkémia létrehozásának az előzőekhez hasonló megközelítését alkalmazzák. Lényegük, az iszkémizált végtag teljes,^{83, 84} vagy részleges (a femorális érkepletek, illetve az idegelemek megmaradnak) elválasztása a testtől (13. ábra).⁸⁵⁻⁸⁸

A modell főként kistermetű állatokon került alkalmazásra.

Előnye, hogy kisállat-modellben is teljes iszkémia hozható létre viszonylag nagy tömegű izomrost kirekesztése mellett (gyűjthető minta mennyiségének növelése



13. ábra: Az amputációs modell a végtag részleges elválasztásával

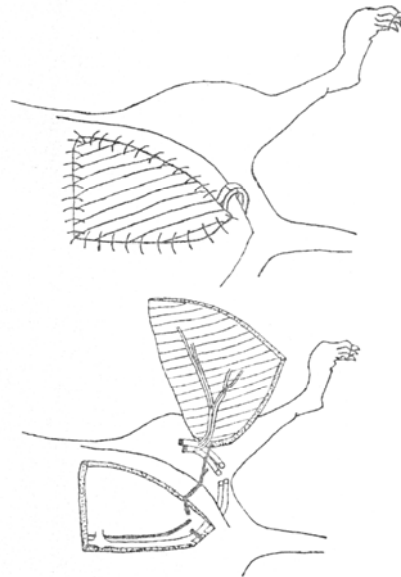
A modell során a végtag a test többi részétől teljes mértékben elválasztásra kerül. A test és a végtag közötti egyetlen kapcsolatot az ér-, illetve idegelemek biztosítják. Forrás: Cunha MS et al. 2005.²

érdekében). Fő hátránya, hogy az amputációból adódóan az izomrostok hossza az eredeti állapothoz képest megrövidül, mely befolyásolhatja az iszkémia toleranciát. Teljes elválasztás során továbbá a képletek átvágásával az idegi szabályozás elvész, valamint ebben az esetben a reperfúziót az érképletek újra egyesítése kell, hogy megelőzze, mely a standardizálhatóságot jelentősen befolyásolhatja.

Az amputációs technika egy módosított változatában, a femorális erek kipreparálását követően azok alatt leszorítást helyeznek el a lábon az izomszövetben futó kollaterálisok megszüntetésére.^{89, 90} A komplett iszkémia a femorális artéria kirekesztésével érhető el.

2.5.1.3. Izomlebenyek alkalmazása

A teljes iszkémia létrehozására egy, az amputációs technikával lényegileg hasonló lehetőségként merül fel a különböző izomlebenyek alkalmazása. A módszer a plasztika sebészetben gyakran alkalmazott nyeles lebenyek elvén alapul: egy izomrészletet a hozzátartozó vaszkuláris nyéllel a többi szövetből különválasztásra kerül, melynek így egyedüli vérrellátását a vaszkuláris nyélben futó artéria biztosítja (14. ábra). Ennek kirekesztésével tehát teljes iszkémia hozható létre. A klasszikus latissimus dorsi lebenyek mellett⁹¹ alsó végtagi izomlebenyek,⁹ illetve hasi lebenyek⁹² is használatosak az irodalomban mind kis-, mind nagyállat modelleken.



14. ábra: **Hasi izomlebeny**

Hasi izomlebeny képzése során egy adott érnél által ellátott hasizomrészlet a környező szövetektől szeparálásra kerül, majd ez követően anatómiai pozícióban rögzítik a sarcomerhossz állandósága érdekében.

Forrás: Picard-Ami LA et al. 1990.⁹

2.5.1.4. Külső leszorítás alkalmazása

Az irodalomban leggyakrabban használt módszer alapjait Friedrich von Esmarch fejlesztette ki az 1800-as évek közepén alsó végtagi háborús sérülések operációja során fellépő nagy vérveszteség csökkentésére.⁹³ Az eredeti eszköz egy háromszögletű vászonkendő volt melynek alapja 1,2 m szélessége pedig 0,8; 0,8 méteresek voltak (15. ábra).



15. ábra: Az Esmarch kendő

A kendő szorosan a végtag köré tekerésével teljes vértelenség érhető el. A későbbi alkalmazások során kiderült, hogy elégséges a comb proximális részére leszorítást felhelyezni a vértelenség elérésére. A legújabb technikák alkalmazásával pedig már felfújható mandzsetták (más néven tourniquet) felhelyezésével, azok szisztolés nyomás fölé pumpálásán



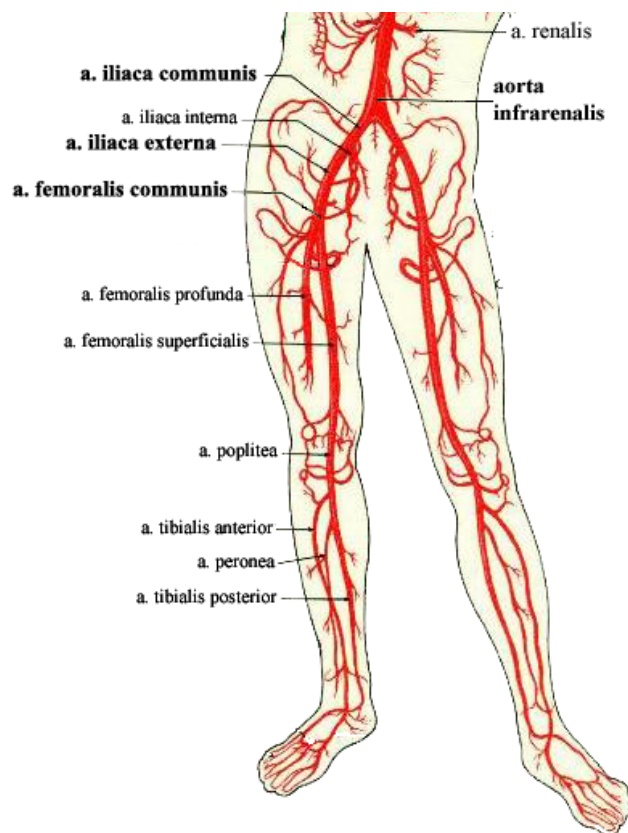
keresztül érhető el a teljes vértelenség (16. ábra). A módszer alkalmazása egyszerű, gyorsan kivitelezhető, így az irodalomban leggyakrabban alkalmazott eljárássá vált a teljes mértékű iszkémia létrehozására.⁹⁴ Kétségek felmerültek ugyan azzal kapcsolatban, hogy a módszer valóban teljesen képes megszüntetni a végtagi keringést, azonban ma

már az eljárás hatékonysága igazoltnak tekinthető.⁹⁵ A módszer hátránya, hogy a mechanikus kompresszió nemcsak az ellátó artériát, hanem a vénát, az idegelemeket, valamint az izmokat is komprimálja. A véna leszorítása,⁸² valamint a végtagi idegelemek kompressziója⁹⁶ növelheti az izomkárosodás mértékét egy nem kompressziós modellhez képest, valamint az izomszövet is, pusztán a mechanikai erőből addicionális károsodásokat szenvedhet.⁹⁷

2.5.2. Reziduális perfúziós modellek

Ezen kísérleti modellek által létrehozott iszkémia mértéke nem teljes, hiszen eljárástól függő mértékben, valamilyen mennyiségű reziduális perfúzió fennmarad, így egységnyi idő alatt kevesebb károsodás alakul ki alkalmazásuk által, egy teljes iszkémiás modellhez viszonyítva. Ezen modellek alapja egy adott területet ellátó egy, vagy több artéria kirekesztése a keringésből, a reziduális perfúziót a nem ligált kollaterálisok biztosítják (17. ábra).

A modellek hátránya, hogy alkalmazásuk nagy körültekintést igényel. A különböző nagyerek kirekesztése során a reziduális



17. ábra: Az alsó végtagot ellátó artériás hálózat a reziduális perfúziós modellek során leggyakrabban kirekesztett erek kiemelésével

Forrás: <http://mlkshk.com/p/CU70>

perfúzió mértéke eltérhet, így a különböző kirekesztések más-más szituációk modellezésére alkalmasak. A reziduális perfúzió mértékének pontos ismerete tehát elengedhetetlen egy modell alkalmazásakor. További hátrány, hogy a reziduális perfúzió mértéke a végtag aktív mozgása során változhat,⁹⁸ így az iszkémia alatt nagy figyelmet kell fordítani a végtag mozgásainak elkerülésére (például folyamatos mély

altatás bevezetése). Egy további hátrány, hogy nőstény állatokban a kollaterális hálózat jóval gazdagabb lehet, így a nemek között a károsodás mértéke azonos hosszúságú iszkémiás idők alkalmazása mellett is eltérhet a reziduális perfúziós modellek során, melyet egy kísérlet tervezése során figyelembe kell venni.⁹⁹

A modellek nagy előnye azonban, hogy a nagyereken végzett sebészeti beavatkozások, akut nagyér-elzáródások klinikumának modellezésére kifejezetten alkalmasak, hiszen klinikai körülmények között ilyen esetek kapcsán az iszkémia mértéke sosem teljes.⁹⁶

2.5.2.1. Femorális szintű kirekesztés

A femorális artéria kirekesztése esetében a reziduális perfúzió mértéke viszonylag magas, illetve a létrehozott iszkémia nem tartós, a meglévő kollaterálisok gyorsan alkalmazkodnak a megváltozott helyzethez, így ezen kirekesztés csak rövid iszkémiás idők modellezésére alkalmazható.^{98, 100}

2.5.2.2. Iliaca szintű kirekesztés

Az artéria iliaca kirekesztése (általában a communis, vagy externa szintjében) a femorális artériához képes nagyobb mértékű iszkémiát képes létrehozni.¹⁰¹ Mivel azonban a modellállatok, főként a kisebb testűek kollaterális rendszere eltér az emberétől, az artéria iliaca kirekesztése nem okoz olyan mértékű iszkémiát, amely megfeleltethető lenne egy humán szituációnak,⁹⁸ így ezen eljárások főként a krónikus iszkémiával járó verőérbetegségek modellezésére alkalmazhatók.¹⁰²⁻¹⁰⁴

2.5.2.3. Aortakirekesztés az infrarenális szakaszon

Az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése a legtöbb állatban elegendő súlyosságú iszkémiát képes létrehozni,⁹⁸ kismértékű reziduális perfúzió megtartottsága mellett, így ezen kirekesztési forma már alkalmas lehet egy érsebészeti szituáció modellezésére. Ez a modell sem mentes azonban a hátrányoktól: Az aorta kirekesztése

mindkét oldali alsó végtag iszkémiás károsodásához vezet, így egy belső kontroll használatának (általában az ellenoldali, nem iszkémiás végtag használatos erre a célra) lehetősége elvész. Ezen hátrány azonban könnyen kiküszöbölhető áloperált állatok, vagy kezeletlen kontroll állatok alkalmazásával. Egyes szerzők továbbá a belső kontroll alkalmazásának helyénvalóságát kétségbe vonják, ugyanis a távoli szervi hatások következtében a belső kontroll állapota is megváltozhat.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Az infrarenális aorta kirekesztésnek módosított változatai is léteznek, melyek során a lumbális kollaterálisok ligációjával,¹⁰⁸ vagy úgynevezett terminális devaszkarizációval^{109, 110} (az adott izomhoz futó összes kollaterális megszüntetésével) iszkémia foka növelhető. Ezek a módosítások azonban közelebb állnak a teljes iszkiémiát létrehozó modellekhez, így az érsebészeti szituációkat modellező képességük elvész.

2.5.2.4. Több ér szimultán kirekesztése

Ezen modellek a femorális és iliaca kirekesztések hatékonyságának növelésére szolgálnak több ér egyidejű kirekesztésével. Alkalmazásra került eddig az a. iliaca communis + a. femoralis + a. epigastrica infeior;⁶⁰ az a. ilica communis + a. femoralis;¹¹¹ az a. femoralis + az aortából jövő összes kollaterális;⁹⁸ az aorta + a. femoralis;¹¹² valamint mindkét oldali iliaca communis¹² szimultán ligációja. Bonyolultságuk miatt azonban a gyakorlatban nem terjedt el alkalmazásuk.

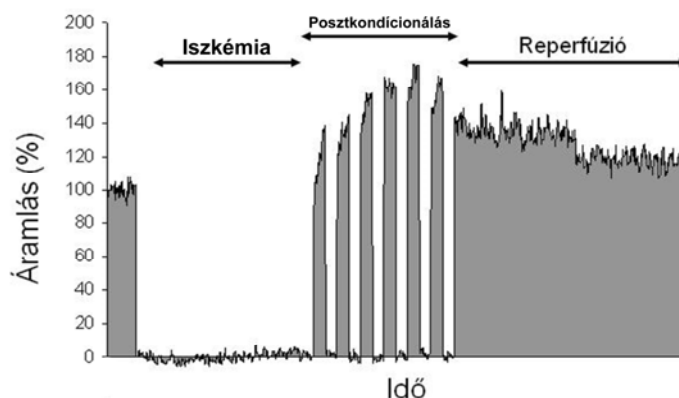
A fent említett technikákon kívül léteznek kevésbé gyakran alkalmazott modellek is, melyeknél a reziduális perfúzió mértéke nem tisztázott.^{113, 114}

2.6. Posztkondicionálás

A hosszú idejű akut alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodással járó kórképek súlyos szövödményeinek mérséklésében az izomkárosodás mértékének pontos meghatározása mellett a megelőzés is nagy szerepet játszhat. A kialakuló komplikációk megelőzése az iszkémiás-reperfúziós károsodás csökkentésén keresztül lehetséges. Számos technika áll rendelkezésre, mely a sérülés mértékét hivatott csökkenteni,^{115, 116}

akut alsó végtagi verőér-elzáródások esetén azonban az ún. poszt kondicionálás tűnik a legmegfelelőbb eljárásnak.

A poszt kondicionálás (PC) a szöveti véráramlás ismételt, rövid, több ciklusban alkalmazott megszakítása a reperfüzió kezdetén (18. ábra). A szerv szabad perfúziója csak ezen ismételt, rövid iszkémiás-reperfüziós epizódokat követően jön létre.

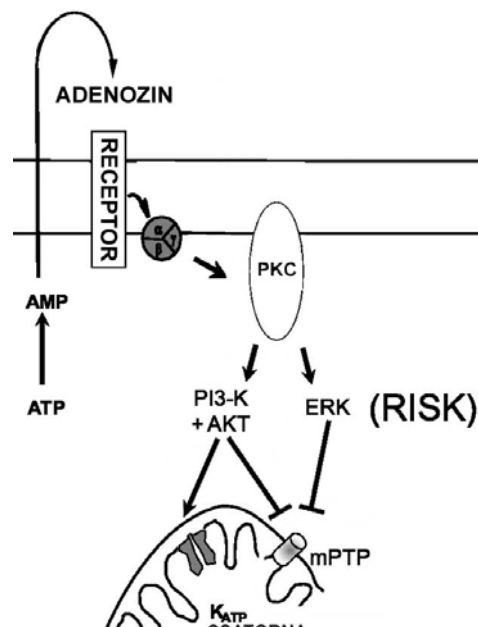


18. ábra A poszt kondicionálás

Poszt kondicionálás során az iszkémia végén alternáló reperfüziós, reokklúziós periódusokat alkalmazunk.

Az eljárás koncepcióját először Na és munkatársai fogalmazták meg 1996-ban,¹¹⁷ sikeres alkalmazása azonban 2003-ig váratott magára, mikor is Zhao és munkatársai megfelelően rövid ciklushosszak alkalmazásával igazolták a poszt kondicionálás hatékony voltát.¹¹⁸ Mint később kiderült, a kezdeti sikertelenségek hátterében a poszt kondicionáló ciklusok időtartamának nem megfelelő megválasztása állt, mely kifejezetten fontos a kifejlődő hatás szempontjából.¹¹⁹ Az ezt követő vizsgálatok kiderítették továbbá, hogy a reperfüzió első pillanatai kritikusak abban, hogy a poszt kondicionálás kifejttesse protektív hatását, a ciklusokat a reperfüzió megindulása után 1 perccel elkezdve a károsodás csökkentő hatás elvész.¹²⁰ Az alkalmazott ciklusok száma úgy tűnik, sokkal kisebb jelentőséggel bír, mint az időben elkezdett manőver.¹²¹

A poszt kondicionálás védő hatásának hátterében számos molekuláris mechanizmust azonosítottak (19. ábra). Szerepet játszanak különböző aktivátor molekulák (adenozin), intracelluláris mediátorok (reperfusion injury



19. ábra: A poszt kondicionálás szubcelluláris effektorai

Forrás: Cohen MV et al. 2010.

survival kinases), és effektor molekulák (mitokondriális adenosin-trifoszfát szenzitív K^+ csatornák (K^+_{ATP}), mPTP; 19. ábra).

Az iszkémia alatt az ATP lebomlása során adenosin képződik. Poszt kondicionálás alkalmazásával ezen molekula kimosódása elnyújtott, így megfelelő koncentrációban képes a sejtfelszíni receptorokhoz kötődni,¹²² ezzel csökkenteni a reaktív oxigén gyökök és citokinek felszabadulását, valamint a gyulladásos sejtek aktivációját, adhézióját.^{123, 124}

Különböző molekuláris jelátviteli utaknak is szerepet tulajdonítanak a védő funkció kifejeződésében. Ezen folyamatok résztvevői az ún. „reperfusion injury survival kinase”-ok, mint például a PI-3-kináz,¹¹⁹ illetve az Akt (Protein-kináz B).¹²⁵ A felsorolt kinázokon kívül a poszt kondicionálás során aktiválódó és a Ca^{2+} szint csökkenésében szerepet játszó PKC- ϵ (Protein-kináz C- ϵ) enzim is meghatározó a celluláris károsodás csökkentésében.¹²⁶

Az ATP szenzitív K csatornák (K^+_{ATP}) mitokondriumban található izoformájának is nagy szerep tulajdonítható poszt kondicionálás során.¹¹⁹ A mitokondriális K^+_{ATP} csatornák nyílásával egyrészt csökken a mitokondriális Ca^{2+} -többség, így kevésbé sérül ezen sejtorganellek integritása,¹²⁷ másrészt a csatorna feltételezhetően a mitokondriumok alakját is megváltoztatja, ami az elektron-transzport javulását eredményezi.¹²⁸

A fenti mediátorokon, enzimeken és ioncsatornákon kívül a poszt kondicionálás kiemelten fontos célpontjai a mitokondriumok mPTP csatornái. Iszkémia alatt a csatornák zárt állapotban vannak, majd a reperfüzió első percei során nyílnak meg. Mint már említésre került a korábbi fejezetekben az mPTP csatornák megnyílása meghatározó szerepet játszik a sejthalálban. A csatornák nyitási mechanizmusára trigger faktorként hat a mitokondriális mátrix Ca^{2+} koncentrációjának növekedése, a mitokondriális belső membrán normális membránpotenciáljának megváltozása, illetve a különböző szabadgyökök magas koncentrációja.²⁴ Poszt kondicionálás alkalmazásával csökken a csatornanyitás valószínűsége, mivel a módszer csökkenti a szabadgyökök képződést és az intramitokondriális magas Ca^{2+} szintet.¹²⁰

Az első publikációk főként a szívizomszövet iszkémiás-reperfüziós károsodásával kapcsolatban történt vizsgálatokról számoltak be. Azóta számos közlemény született, melyek nemcsak szíven, hanem egyéb szerveken (vese, vékonybél,

tüdő, izomszövet) is igazolták az eljárás iszkémiás-reperfúziós károsodás csökkentő hatását.¹²⁹ Izomszövet esetében az első sikeres alkalmazás McAllister és munkacsoportja nevéhez fűződik 2008-ból.¹³⁰ Az azóta eltelt több mint fél évtized alatt azonban csak csekély számú közlemény született a poszt kondicionálás izomszövetre gyakorolt hatásainak vizsgálatára. Ezen közlemények igazolták, hogy az eljárás pozitívan befolyásolja az izom szövettani képét,^{130, 131} az izomfunkciót,¹³² a szöveti redox státuszt,^{16, 108, 131, 133, 134} a mitokondriális funkciót,^{108, 130} a szérum izom-specifikus nekroenzim szintjeit,^{133, 135} a szöveti gyulladásos választ,^{16, 130-132, 134} valamint a kialakuló ödéma mértékét.¹³¹⁻¹³³ A poszt kondicionálás ezeken felül szubcelluláris változásokat is indukál az izomszövetben. A módszer kedvezően befolyásolja a HIF-1 α ,¹³⁵ VEGF,¹³¹ mTOR,¹³⁵ és néhány pro- és anti-apoptotikus protein (Bax, Bcl-2)^{134, 135} izomszöveti mRNS szintjét.

Munkacsoportunk korábbi kutatásai alapján elmondhatjuk azt is, hogy a poszt kondicionálás kedvező hatásait nemcsak lokálisan, hanem a távoli szervekre vonatkozóan is képes kifejteni, feltehetőleg a szisztémás gyulladásos válaszreakció mértékének mérséklésén keresztül.¹³⁶

Akut alsó végtagi verőér-elzáródások kapcsán a különböző eljárások közül a poszt kondicionálás látszik a legmegfelelőbb módszernek az iszkémiás-reperfúziós károsodás csökkentésére. Ennek magyarázata metodikájában rejlik, hiszen a repurfúzió kezdetén, egyszerűen alkalmazható eljárásról beszélünk, melynek mellékhatása mindezidáig nem jelentkezett.

2.7. Esetismertetés

A bevezetés utolsó alfejezetében, az elméleti és a gyakorlat összekapcsolásaként egy mindkét alsó végtagot érintő, prolongált 3 napos iszkémiát követően operált betegünk esetét mutatjuk be. Bár a többszörös rekonstruktív érműtétekkel az elzárt nagyerek rekanalizációja sikeres volt, az elhúzódó végtagi iszkémia következtében súlyos lokális és szisztémás szövődmények alakultak ki, melyek az intenzív osztályon végzett kezelés ellenére a beteg halálához vezettek. A kazuisztika célja az alsó végtagi akut hosszú idejű verőér-elzáródások bevezetésben részletezett szövődményeinek, egy

konkrét klinikai eset kapcsán történő bemutatása, mely a kísérletes és klinikai vizsgálatok szükségességét megalapozza, azok fontosságára hívja fel a figyelmet.

Az eset a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikájának beteganyagából került ki. Az eset feldolgozási módszerei során az esetadatokat kigyűjtésére, valamint forráselemzésre került sor. A következtetések levonása patológus kolléga segítségével történt (Dr. Lotz Gábor, egyetemi docens, Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet, Budapest).

A laborparaméterek meghatározása rutin klinikai tesztek elvégzésével történt (Semmelweis Egyetem, Központi Laboratórium), a vizelet mioglobulin kimutatására Chek4®-Myoglobin Urine Test-et (Quadrantech Diagnostic Ltd, Epsom, Egyesült Királyság) alkalmaztunk. A *post mortem* vizsgálatok során szövettani mintavételre sor a m. sternocleidomastoideusból (kontroll izomminta), a m. rectus femorisből (felületes, iszkémiás izomminta), a m. vastus intermediusból (mély, iszkémiás izomminta), a tüdőből, szívből, májból és vesékből. A szövettani metszetek mikroszkópos vizsgálatára rutin patológiai feldolgozást (formalin fixálás, paraffinba ágyazás, hematoxillin-eozin festés) követően került sor (Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet, Budapest). A mioglobin szövettani metszeteken történő kimutatására benzidin-peroxidáz reakciót,¹³⁷ és anti-mioglobin immunhisztokémiát alkalmaztunk (primer antitest: nyúl poliklonális anti-humán myoglobin; RP 029, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, Egyesült Államok). A vesében a cortex és medulla határán található barna színű intracelluláris pigment eredetének meghatározására Berlini-kék, valamint Sudan Black B festéseket alkalmaztunk. A minta autofluoreszcenciáját Leica DM RXA motorizált fluoreszcens mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk 400x-os nagyításon. A képeket Leica DFC365 FX (Leica Microsystems) monokróm digitális kamerával rögzítettük Texas Red, FITC és DAPI filterek alkalmazásával. A filterekkel készült képek egybeolvasztását (rendre: vörös, zöld és kék csatornák) CW4000 FISH szoftver (Leica Microsystems) segítségével végeztük.

A bemutatásra kerülő 55 éves férfibeteg anamnézisében hosszan tartó dohányzás, hipertónia, hiperlipidémia, iszkémiás szívbetegség, krónikus pitvarfibrilláció, krónikus bronchitis, depresszió, proximális szelektív vagotómia, cholecystectomy és hasfali rekonstrukció szerepel. Dysbasiás panaszai 7 éve

kezdődtek, azóta a beteg több rekonstruktív érsebészeti beavatkozáson esett át más intézetben (jobb oldali a. iliaca communis perkután transzlumináris angioplasztika; jobbról balra vezetett ilio-femorális crossover bypass; jobb oldali ilio-femorális bypass; jobb oldali femoro-poplitealis supragenuális Dacron bypass).

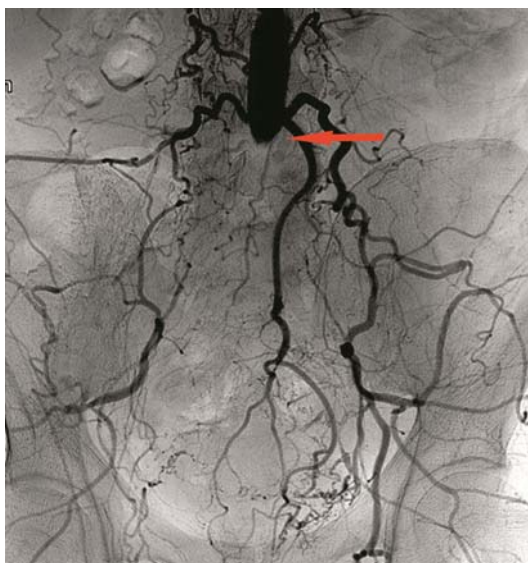
Felvételére 3 nappal korábban, hirtelen kezdődő a jobb, majd a bal alsó végtagon kialakult fájdalom és járásképtelenség miatt került sor. Felvételnél csípőtől lefelé mindkét oldali alsó végtagban nyugalmi fájdalomra panaszkodott. A fizikális vizsgálat során pulzus egyik végtagon sem volt tapintható a végtagok egész területén. Mindkét alsó végtag az akut artériás elzáródás klinikai tüneteit mutatta a végtagok hűvösségével, mozgásképtelenségével, súlyos, nyugalmi végtagfájdalommal és végtagduzzadással.

2. táblázat: **Pre- és posztoperatív laboratóriumi eredmények**

Az azonnali laborvizsgálatok (2. táblázat) emelkedett fehérvérsejt számot valamint CK szintet igazoltak. Az alvadási paraméterek (INR, APTI), májenzimek (GOT, GPT) valamint	Paraméter	Mértékegység	Normál tartomány	Felvételkori érték	Posztoperatív érték
	LDH	U/L	110-210	196	28377
	GOT	U/L	5-45	20	8110
	GPT	U/L	5-45	17	6340
	CK	U/L	24-195	742	102920
	CK-MB	U/L	0-34	45	277
	INR	-	0,8-1,2	1,2	6,1
	APTI	sec.	30-40	34	180
	pH _{artériás}	-	7,35-7,45	7,39	7,2
	Kreatinin	μM/L	60-110	76	310
	Amiláz	U/L	30-100	42	800
	Lipáz	U/L	10-60	14	1620

a szérumban karbamid, kreatinin, kálium és CK-MB koncentrációk nem mutattak kóros eltérést. Tekintettel a beteg anamnézisére urgens angiográfiát végeztünk, mely az aorta bifurkáció alatti komplett elzáródását igazolta a korábban végzett disztális rekonstrukciók teljes elzáródása mellett (20. ábra). Az elvégzett vizsgálatok alapján akut műtétet javasoltunk.

Kétoldali lágyékhajlati, illetve supragenuális popliteális feltárást



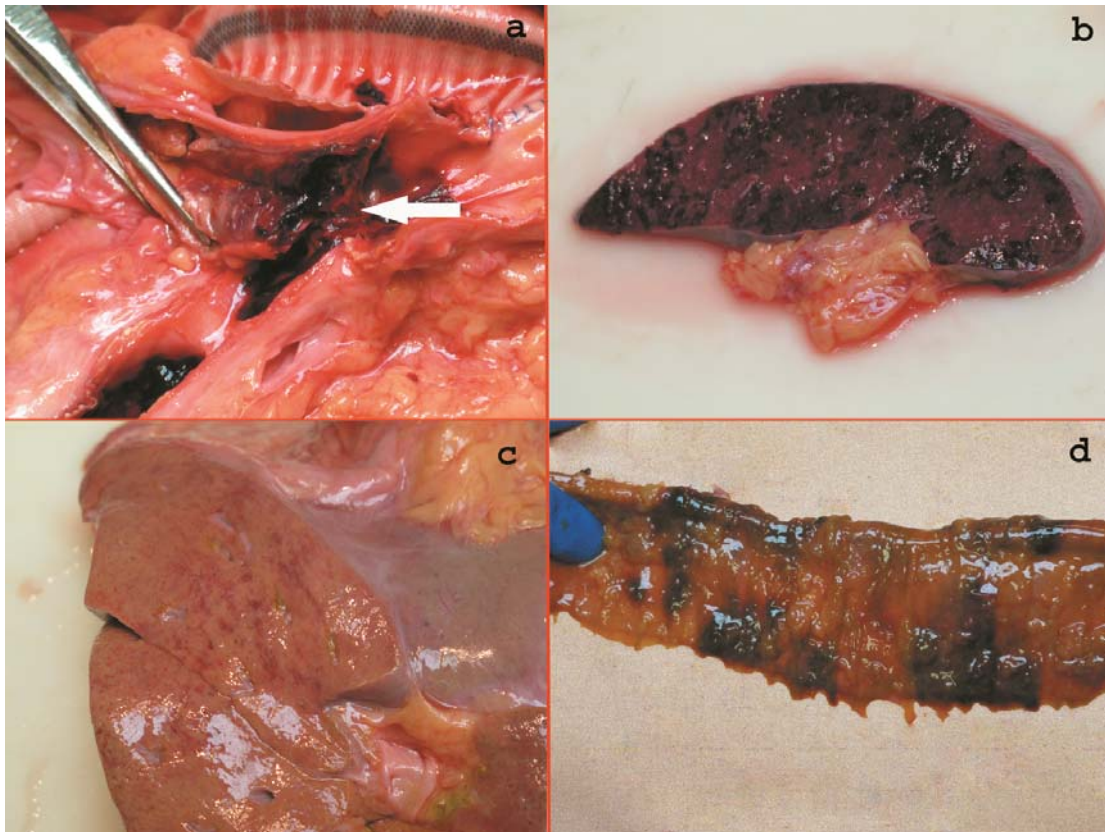
20. ábra: Az angiográfiás kép az aorta disztális szakaszának elzáródását mutatja

végeztünk. A korábbi graft-rendszerek revíziója mindhárom graft elzáródását mutatta. Embolektomiát Fogarty szerint végeztünk,¹³⁸ a rekanalizáció azonban csak átmenetileg bizonyult sikeresnek: néhány percen belül a graft-rendszer ismételt elzáródását észleltük. A graft-rendszer ezért lebontásra került, a fennálló helyzet megoldására pedig egy aorto-bifemorális bypassst helyeztünk fel, a megfelelő végtagperfúzió biztosítására. Mindemellett mindkét lábszár mindhárom izomrekeszén elvégeztük a preventív fasciotomiát. A műtét végén a perifériás pulzusok mindkét oldalon tapinthatóvá váltak. A közvetlen posztoperatív szakban folyamatosan romló alsó végtagi keringést észleltünk a végtagok jelentős mértékű duzzadása mellett. A posztoperatív 6. órában reoperáció vált szükségessé, melynek során dezobliterációt végeztünk, valamint a fasciotomiát mindkét oldali comb izomrekeszeire is kiterjesztettük. A műtét végén jó femorális és popliteális pulzus volt tapintható.

A sikeres revaszkularizációt követően a beteg állapota fokozatosan romlott, súlyos többszervi elégtelenség alakult ki, mely alig több mint 24 óra alatt a beteg halálához vezetett:

A műtétet követően a beteg laboreredményeiben (2. táblázat) a szérum kreatin-kináz, laktát-dehidrogenáz szintek jelentős emelkedést mutattak, mely súlyos fokú izomkárosodásra utal. A beteg respirációja a posztoperatív szakban folyamatosan romlott, végül gépi lélegeztetés vált szükségessé. A szérum kreatinin szint több mint háromszorosára emelkedett, a beteg fokozatosan oligúriássá vált a folyamatos diuretikus kezelés ellenére, így akut hemodialízisre kényszerültünk. A csekély mennyiségű ürült vizeletben miogloblin jelenléte volt igazolható. A májenzimek is jelentős emelkedést mutattak, valamint az alvadási paraméterek folyamatos romlása volt megfigyelhető. Szisztémás acidózis alakult ki, mely bikarbonát adásával sem volt rendezhető. A beteg keringése fokozatosan romlott, ugyan folyamatosan emelkedő dózisú vazopresszor terápiával (noradrenalin, 5 - 7,5 µg/ttkg/óra) a megfelelő vérnyomást egy ideig sikerült biztosítani, azonban a posztoperatív 19. órában progresszív keringésromlás volt megfigyelhető. A műtét utáni 27. órában a beteg keringése összeomlott. A laboratóriumi vizsgálatok emelkedett CK-MB szintet igazoltak.

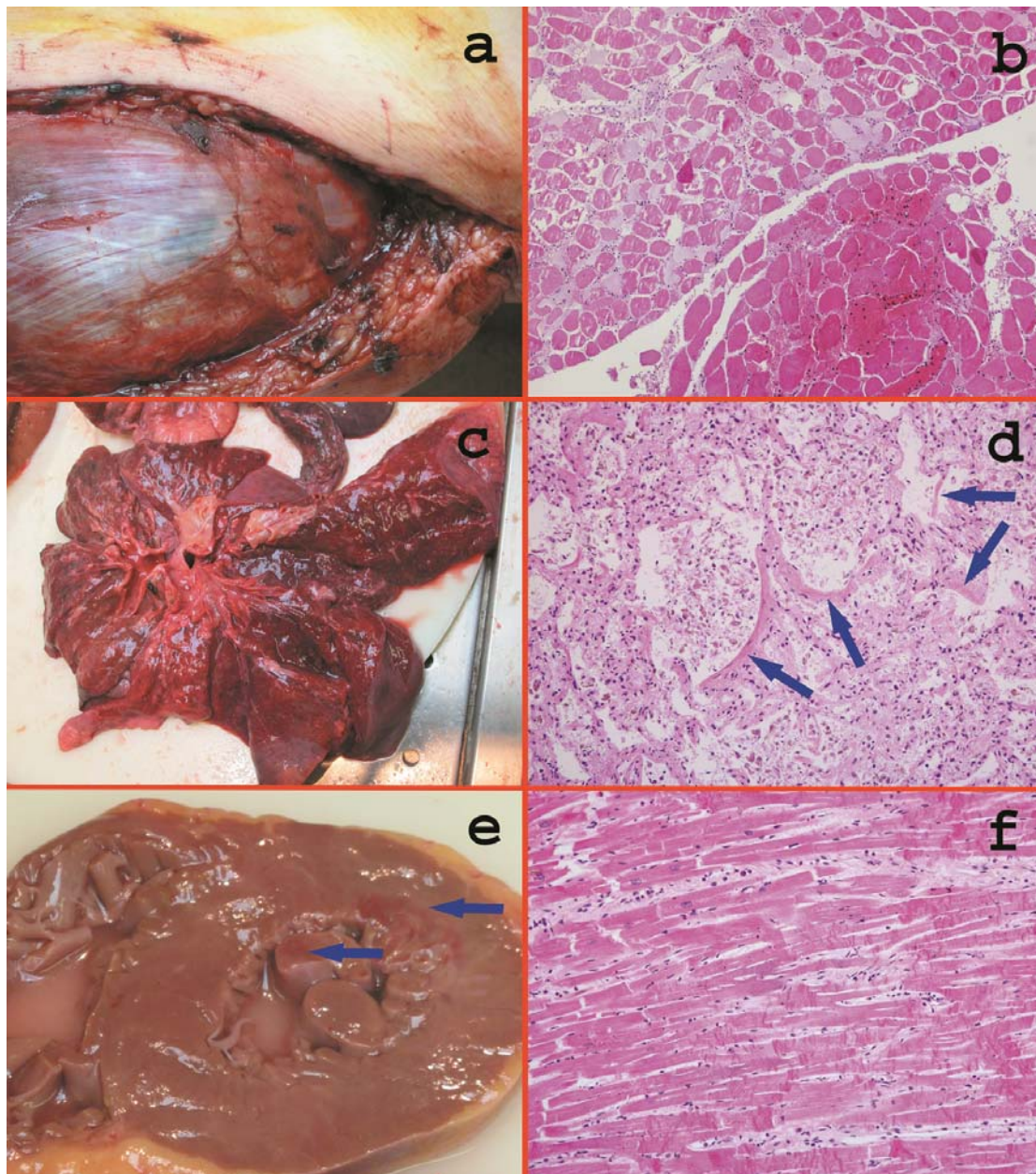
A klinikailag is látható többszervi elégtelenség igazolására boncolást végeztünk, mely alátámasztotta klinikai megfigyeléseinket (a szekció a halál beálltát követő 3 napon történt, a törvények előírásának megfelelő tárolást követően). A boncolás során a hasi aorta teljes elzáródását láttuk, a bifurkáció magasságában lévő réteges, száraz tapintatú trombus által. A szervült trombust az átjárható aorto-bifemorális bypass graft áthidalta. A jobb oldali femoro-popliteális bypass lumene szabadnak mutatkozott (21/A. ábra).



21. ábra: **A különböző szervek makroszkópos megjelenése a boncolás során**

- a: a képen a thrombussal (nyíl) kitöltött aorta, valamint a szabad lumenű aorto bifemorális graft látható;
- b: a lép állományában halvány és bevérzett területek láthatóak;
- c: a májban halványabban ábrázolódó parenchima, valamint pontszerű bevérzések ábrázolódnak;
- d: a jejunum nyálkahártyáján sötétvörös foltozott mukózális infarktuszok figyelhetők meg, fokális, szegmentális mintázatban.

Az alsó végtagok *post mortem* megtekintése során a duzzadt izomzat a fasciotómias nyílásokon kitüremkedett, feszes tapintatú volt (22/A. ábra). Az alsó végtagi harántcsíkolt izomzatból egy felületesebb és egy mélyebb mintavétel történt *post mortem*. Mikroszkóp alatt a felületesebb részben nekrotikus izomrostok láthatók, gyulladásos sejtes beszűrődéssel, azonban a metszetek körülbelül felén kevésbé károsodott izomrostok is megfigyelhetők (22/B. ábra). Ezzel szemben sokkal súlyosabb károsodást láthatunk a mélyebb rétegek metszetein, ahol ép területek nem voltak



22. ábra: Az egyes szervek boncolást követő makro (a, c, e)- és mikroszkópos (b, d, f) megjelenése
a, b: vázizom (m. quadriceps femoris); c, d: tüdő; e, f: szívizom. Festés: Hematoxillin-eosin
Mikroszkópos képek eredeti nagyítása: 200x.

láthatóak. Súlyosan bevérzett és elhalt részek váltakozása volt jellemző ezen területekre.

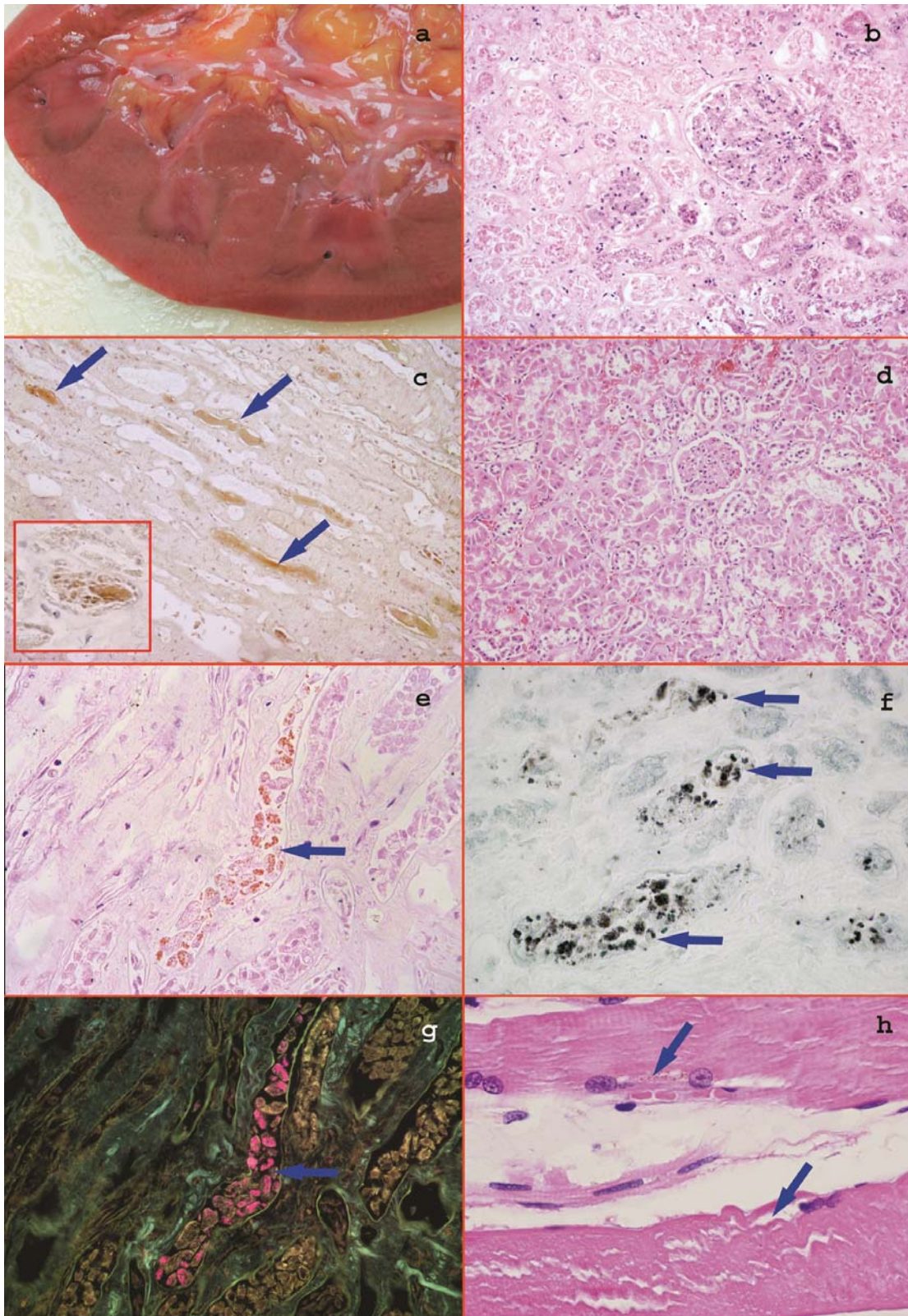
A tüdő metszlapja vörösen foltozott, tészta tapintatú volt, nyomásra híg habos szilvalészerű folyadék ürült belőle (22/C. ábra). Szövettani morfológiája az ARDS klinikai képével megegyezően, a kórkép korai, exszudatív szakaszának volt megfeleltethető: sok helyen atelektáziás területek, hialin membrán kezdemények és levált sejtek voltak láthatóak az alveolusok lumenében (22/D. ábra).

A szív bal kamrájában makroszkóposan 1,5 cm átmérőjű transzmurális infarktus volt detektálható (22/E. ábra), mely mellett szövettanilag több mikroinfarktust magában foglaló terület volt megfigyelhető, valamint a góciókban gyulladásos sejtes beszűrődés volt jelen (22/F. ábra).

A lép állománya morzsalékony volt, metszlapján halvány és bevérzett területek voltak jelen (21/B. ábra). A máj metszlapján halványabban ábrázolódó parenhima, bal lebenyében 5 cm-es területen pontszerű bevérzések voltak láthatóak (21/C. ábra). Szövettanilag zsíros degeneráció alakult ki a máj véna centrálisai körül egyidejű fibrózis nélkül, mely a degeneráció akut kialakulására utal.

A jejunum nyálkahártyáján sötétvörös foltozott mukózális infarktusok voltak megfigyelhetőek, fokális, szegmentális mintázatban (21/D. ábra), míg az ileum nyálkahártyája épnek mutatkozott. Akut pankreatitisznek megfelelő apró nekrotikus góciók voltak láthatóak a peripankreatikus zsírszövetben valamint a gyomor nyálkahártyáján eróziók alakultak ki.

Makroszkóposan a vesék megduzzadtak, felszínük halvány árnyalatú volt. A kéreg-velő állomány határa élesen elkülönült, jelentősen készélesedett (23/A. ábra). Mikroszkóposan az akut tubuláris nekrozis súlyos jelei voltak megfigyelhetőek (23/B. ábra). Egy másik, vesekárosodást nem mutató betegből készült meszet alapján, mely kontrollként szolgált, elmondható, hogy a súlyos vesekárosodás nem a boncolás során kialakuló autolízis következménye, hanem az alsó végtagi károsodás direk szövödménye. A kontroll metszeteken ugyanis érdemi morfológiai károsodás nem volt látható (23/D. ábra). A csupán sporadikusan előforduló megtartott szerkezetű juxtamedulláris proximális tubulusok illetve főként a gyűjtőcsatornák lumenében kifejezett eozinofiliát mutató, homogén precipitátumok voltak láthatóak, melyekben az említett speciális festési eljárásokkal mioglobint jelenléte volt igazolható (23/C. ábra). A kéreg-velő határán elhelyezkedő proximális tubulus sejtekben továbbá barna színű



23. ábra: **A vesében látható elváltozások** (Festés: hematoxin-eosin [b, c, d, e, g, h], Sudan Black B [f])
 a: makroszkópos elváltozások; b: akut tubuláris nekrosis mikroszkópos képe; c: mioglobin jelenléte a disztális és a proximális (inzer) tubulusokban; d: kontroll vese szövettani képe; e: barna pigment a proxiális tubulusban, mely Sudan festéssel feketére festődik (f), valamint autofluoreszcenciát mutat (g); h: a szétesett izomrostokból lipofuszcín granulomok szabadulnak ki.

Eredeti nagyítás: 200x [b, c, d], 400x [e,g], 600x [c_{insert}, f, h]

granuláris pigment jelenléte volt megfigyelhető (23/E. ábra). Az elvégzett Berlini-kék

festés negatív volta a pigment hemosziderin tartalmát kizárta. A pozitív Sudan Black B festés (23/F. ábra), illetve a granulumok fokozott autofluoreszcenciája (23/G. ábra) azonban arra utalt, hogy a pigment a tubulus sejtekben jelenlévő lipofuszcinnak felel meg. Minthogy a vizsgált, lipofuszcint tartalmazó tubulussejtek relatíve épnek mutatkoztak a lipofuscin önmagában feltehetőleg nem toxikus a tubulussjetekekre.¹³⁹ Ennek igazolására ismételten átvizsgáltuk az izmok szövettani metszeteit, melyeken az izomrostokban lipofuscin jelenléte volt igazolható, illetve néhány metszeten a széttöredezett rostokban a lipofuscin felszabadulása is azonosítható volt (23/H. ábra).

Jelen alfejezetben tehát egy 72 órás hosszúságú, akut alsó végtagi iszkémiát elszenvedett beteg esetét ismertettük. A gyors érsebészeti beavatkozások a végtag keringését rendezték, azonban az iszkémiás-reperfúziós károsodás szövődményeként súlyos lokális és szisztémás szövődmények alakultak ki. Az alsó végtag jelentős, a végtagok szinte teljes nekrozisával járó károsodása mellett, távoli szervi elégtelenség alakult ki a szívben, tüdőben, a gasztrointesztinális és alvadási rendszerben, valamint a vesékben, mely végül a beteg halálához vezetett. Ezen esetismertetés egy konkrét klinikai példán keresztül mutatja be az alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodások lehetséges következményeit, felhívja a figyelmet ezek lehetséges fatális kimenetelére, valamint az időben való felfedezés fontosságára.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az akut alsó végtagi verőér-elzáródás magas szövődmény rátájú és magas mortalitással járó kórállapot, melynek kedvezőtlen prognózisa a gyakran előforduló hosszú vértelenségi időkkal magyarázható. A magas szövődményekhez azonban nagyban hozzájárul, hogy (1) a károsodás mértéke a jelenleg rendelkezésre álló módszerekkel megfelelő időben nem határozható meg pontosan, (2) a már kialakult szövődmények kezelése még intenzív terápiás háttér mellett sem megoldott. Ezt hangsúlyozandó a dolgozatban bemutatásra kerül egy klinikai eset, mely kísérletet tesz egy súlyos alsó végtagi iszkémiás károsodás fatális szövődményeinek részletekbe menő bemutatására és ezzel érzékeltetve a kérdés aktualitását és kutatásunk transzlációs jellegét.

Az esetismertetés során felvetett problémára először kísérletes, majd klinikai vizsgálatokon keresztül próbálunk megoldást keresni a dolgozatban.

Ezen kísérlet sorozat egyik célja tehát, egy olyan általunk kifejlesztett új eljárás vizsgálata rágszáló modellen, valamint klinikai körülmények között is mely képes lehet az iszkémiás károsodás mértékének terápiás időablakon belüli meghatározására, így a megfelelő terápia megválasztásában fontos segítséget nyújthat. További cél a kialakult károsodás mértékének csökkentésére alkalmas eljárás, a poszt kondicionálás vizsgálata akut alsó végtagi verőér-kirekesztés kisállat modelljén, a súlyos károsodások szövődményeinek mérséklése okán.

Első kísérletünk során a megfelelő modell kiválasztása, a kísérleti körülményeket befolyásoló reziduális perfúzió forrásának pontos feltérképezése volt a cél. Második kísérletünk során az előző kísérlet tapasztalatait felhasználva céloztuk meg az általunk kifejlesztett új módszer hatékonyságának, valamint a károsodás mértékét potenciálisan csökkenteni képes új eljárás a poszt kondicionálás alkalmasságának vizsgálatát kisállat modellben. Végül az állatkísérletes tapasztalatokat felhasználva célunk az általunk alkalmazott eljárás hatékonyságának humán beteganyagon történő értékelése volt, így jutva el egy teoretikus gondolattól a potenciális gyakorlati megvalósulásig.

Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen mértékű károsodást képes létrehozni az aortakirekesztés egy komplett iszkémiás modellhez képest?
2. Milyen mértékű a reziduális perfúzió aortakirekesztés kapcsán és milyen kollaterális érhálózatok azonosíthatók ennek hátterében?
3. A létrehozott iszkémiás időtartamok milyen fény- és elektronmikroszkópos változásokat okoznak az izomszövetben?
4. Hogyan reagálnak a különböző típusú izomrostok az iszkémiára?
5. Az izomrostok életképességének meghatározása alkalmas-e a kialakult károsodást megfelelő érzékenységgel detektálni?
6. A vértelenséget követő rövid reperfúzió befolyásolja-e az általunk kifejlesztett új módszer hatékonyságát?
7. Képes-e az eljárás az izomrost típusok közötti különbségek felismerésére?
8. Klinikai körülmények között alkalmazható-e az általunk kifejlesztett új eljárás a szövettani károsodás jelzésére?
9. Alkalmas-e az eljárás a betegség kimenetelének előrejelzésére klinikai körülmények között?
10. Alkalmas-e a poszt kondicionálás hosszú idejű iszkémiát követően a szövettani károsodás mértékének csökkentésére?
11. Képes-e ezen sebésztechnikai eljárás az izmok életképességének javítására?

12. Hogyan befolyásolja a posztkondicionálás a gyulladást jellemző paramétereket?
13. Képes-e a módszer a sérülés kialakulásának dinamikáját megváltoztatni?

4. MÓDSZEREK

4.1. Állatkísérletes vizsgálatok

4.1.1. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika

4.1.1.1. Etikai háttér

Kísérleteink során az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény, valamint a 243/1998 (XII.31) Kormányrendelet szerint elvárt követelményeknek megfelelően jártunk el. Munkánkat a 22.1/794/003/2009 számú Egyetemi Állatkísérleti Bizottság (Semmelweis Egyetem, Budapest) által kiadott engedély alapján végeztük.

4.1.1.2. Állatok

Mindegyik kísérletünk során 200-250 g súlyú, spf (meghatározott kórokozóktól mentes), hím Wistar patkányokat használtunk (Charles Rivers Magyarország Kft, Budapest). Az állatok az operációt megelőzően száraz tápot és vizet kaptak ad libitum. Tartásuk a napszaki változásokat követő mesterséges világítás mellett, 22-24°C-os hőmérsékleten történt.

4.1.1.3. Csoportbeosztás

Csoportonként az alábbi elrendezésben és számban vontunk be állatokat a kísérletbe (3., 4. és 5. táblázat):

4.1.1.3.1. I. Kísérlet: A reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata

3. táblázat: Csoportbeosztás a reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata során

	3 órás iszkémia	4 órás reperfúzió	n
Aorta okklúzió	+	+	10
Tourniquet kirekesztés	+	+	10
Korróziós öntvények	-	-	10

4.1.1.3.2. II. Kísérlet: Az izomrost életképesség meghatározás vizsgálata

4. táblázat: Csoportbeosztás az izomrost életképesség meghatározás vizsgálata során

	Csoport	Iszkémiás periódus (ó)				Reperfúzió (2ó)	n
		4	6	8	9		
Fiziológiás	Kontroll	-	-	-	-	-	6
Iszkémiás	4I	+				-	6
	6I		+			-	6
	8I			+		-	6
	9I				+	-	6
Reperfúziós	8IR			+		+	6
	9IR				+	+	6

I: iszkémia, IR: iszkémia-reperfúzió

4.1.1.3.3. III. Kísérlet: A poszt kondicionálás vizsgálata

5. táblázat: Csoportbeosztás a poszt kondicionálás hatékonyságának vizsgálata során

Csoport	Operáció típusa	Poszt kondicionálás	Reperfúzió hossza (ó)				n
			2	6	12	24	
Álop _{2ó}	Áloperáció	-	+				6
2IR	8 órás iszkémia	-	+				6
2PC	8 órás iszkémia	+	+				6
Álop _{6ó}	Áloperáció	-		+			6
6IR	8 órás iszkémia	-		+			6
6PC	8 órás iszkémia	+		+			6
Álop _{12ó}	Áloperáció	-			+		6
12IR	8 órás iszkémia	-			+		6
12PC	8 órás iszkémia	+			+		6
Álop _{24ó}	Áloperáció	-				+	6
24IR	8 órás iszkémia	-				+	6
24PC	8 órás iszkémia	+				+	6

IR: iszkémia-reperfúzió, PC: poszt kondicionálás

4.1.1.4. A műtét ideje

A műtéteket mindig azonos időben végeztük, hogy a cirkadián ritmus esetleges zavaró hatásait kizárjuk.

4.1.1.5. Anesztézia

Az anesztézia indukció intraperitoneálisan adott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®) és 7,5 mg/ttkg xilazinnal (Xylasin®), az altatás fenntartására 25 mg/ttkg/óra ketaminnal és 2,5 mg/1 ml/ttkg/óra xilazinnal történt infúziós pumpa segítségével a jobb oldali vena jugularis internán keresztül. Az állatok folyadékpótlására 3ml/ttkg/óra fiziológias sóoldatot infundáltunk intravénásan a kísérlet ideje alatt.

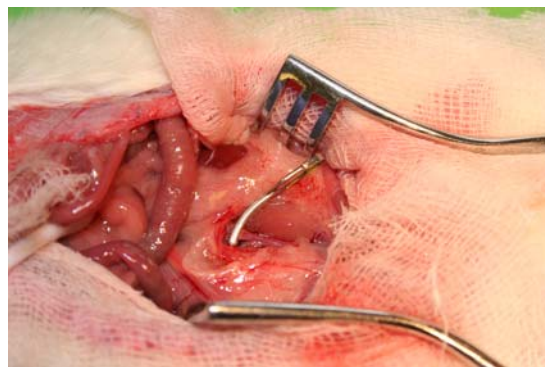
4.1.1.6. Hőmérséklet

Az állatok hőmérsékletét rektálisan regisztráltuk. Fűthető műtőasztal (Homoeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, Holliston, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével az állatok hőmérséklete a kísérletek alatt mindvégig 36,5-37,5°C között volt tartható.

4.1.1.7. A műtét menete

4.1.1.7.1. I. Kísérlet: A reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata

Intraperitoneális anesztéziaindukciót követően a jobb vena jugularis interna kipreparálása után 22 G-s polietilén kanül került bevezetésre, melyen keresztül a műtét időtartama alatt az általános anesztézia fenntartása és a parenterális folyadékpótlás biztosítása



24. ábra: Az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése

történt meg. Ezt az állatok egyik csoportjában medián laparotómia után a hasi aorta kiperarálására került sor az infrarenális szakaszon, ezt követően ebben a csoportban az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklipp (Aesculap YASARGIL FT260T; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország) került felhelyezésre (aorta okklúziós csoport; 24. ábra). Az iszkémia alatt a hasüreget tova futó varratsorral zártuk. Az állatok másik csoportjában laparotómiára nem került sor, az iszkémia létrehozását mindkét végtag köré szorosan tekert gumiszalaggal értük el (tourniquet csoport; 25. ábra). 3 órás hosszúságú iszkémiát követően mindkét csoportban az okklúziót eltávolítottuk, melyet 4 órás hosszúságú reperfúziós periódus követett. A reperfúzió ideje alatt az altatást fenntartottuk (valamint az aorta okklúziós csoportban a hasüreget ismételten kétrétegű tova futó varratsorral zártuk). A kísérlet végeztével az állatokat altatásban a jobb kamra punkcióján keresztül exszangvináltuk, majd izom (m. tibialis anterior) mintavételre került sor.



25. ábra: Külső leszorítás alkalmazása az alsó végtagon

4.1.1.7.2. II. Kísérlet: Az izomrost életképesség meghatározás vizsgálata

Az operáció menete az centrális véna biztosításig teljesen megegyezik az előző kísérletben leírtakkal. Ezt követően medián laparotómiát végeztünk, majd a hasi aorta kiperarálására került sor az infrarenális szakaszon. Ezt az állatok bal lábszárának külső oldalán, a végtag tengelyével párhuzamosan ejtett 2 cm hosszú bőrmetszés követte, majd a fascián ejtett hasonló metszéssel a m. biceps femoris laterális felszíne feltárássra került. A metszésen keresztül a térd felett 0,5 cm-rel mikrocirkulációs áramlásmérő került rögzítésre minden állatban, majd 5 perc alapáramlást regisztrálása történt meg. Ezt követően az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklipp került felhelyezésre (Aesculap YASARGIL FT260T; B. Braun). A kísérlet első részében négy, 6, 8 és 9 órás iszkémiát hoztunk létre mindkét alsó végtagban a mikroklipp felhelyezésével. Az iszkémia alatt a hasüreget tova futó varratsorral zártuk. Mintavételre az iszkémiás idők (4, 6, 8, illetve 9 óra) végén került sor a m. tibialis anteriorból, ezen

kísérleti rész során az iszkémiát reperfúzió nem követte. A kísérlet második részében 8 és 9 órás hosszúságú iszkémiás időtartamokat 2 óra reperfúzió követte. A reperfúzió ideje alatt a hasüreget ismételten kétrétegű tova futó varratsorral zártuk, valamint az altatást fenntartottuk. A műtétek végeztével az állatokat halálos dózisú anesztetikummal túlaltattuk, majd a bal oldali m. tibialis anteriorból mintát vettük rutin szövettani feldolgozás, míg a jobb oldali végtagokat az ellátó artérián keresztül perfúziósan fixáltuk elektron mikroszkópos vizsgálatok elvégése céljából (lásd később).

Az egészséges izomszövet vizsgálatához fiziológiás kontroll állatokat vontunk be a vizsgálatba, mely rágszálókon semmilyen műtéti beavatkozást nem hajtottunk végre. Az állatokat a fent részletezett anesztézia indukciót követően halálos dózisú anesztetikummal túlaltattuk, majd mintát vettünk a fent leírtak szerint.

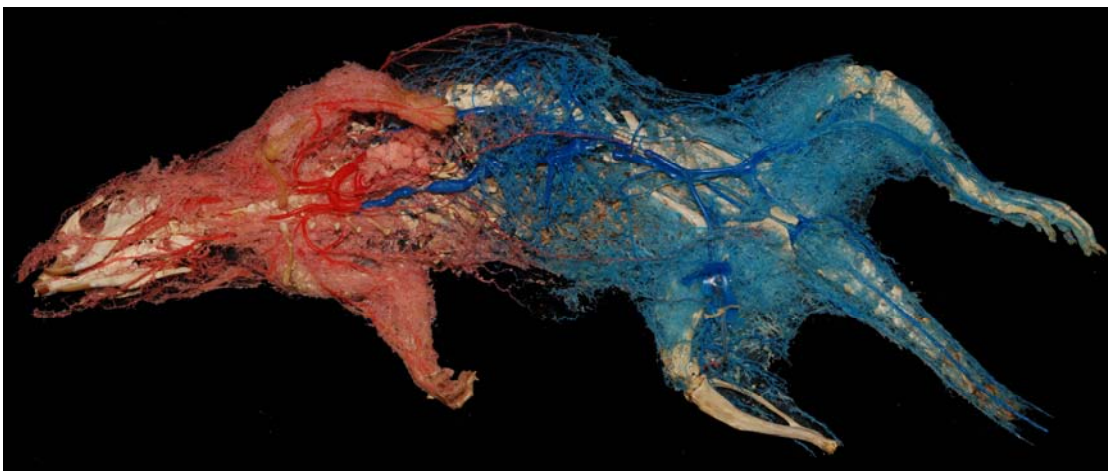
4.1.1.7.2. III. Kísérlet: A poszt kondicionálás vizsgálata

Az operáció menete az iszkémia indukcióig teljesen megegyezik az előző kísérletben leírtakkal. Az előző kísérlettel megegyezően az aortán, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklipp felhelyezésével 8 órás kirekesztést hoztunk létre mindkét alsó végtagban (az iszkémia hosszát a 2. kísérletünk adatai alapján választottuk meg). Az iszkémia alatt a hasüreget tova futó varrattal zártuk. Az iszkémia végeztével a mikroklipp eltávolításra került, majd kettő, 6, 12 és 24 órás reperfúzió következett. Mindegyik reperfúziós időpontban, az állatok egy csoportjában a mikroklipp segítségével poszt kondicionálást végeztünk 6 ciklusban, ciklusonként 10 másodperc reperfúzióval, 10 másodperc reokklúzióval, összesen tehát 2 percen keresztül. A hasfalat a reperfúzió alatt ismételten kétrétegű tova futó varratsorral zártuk. Vér (jobb kamra punkción keresztül) és izom (m. tibialis anterior) mintavételre a reperfúzió végén került sor, melynek menete megegyezik az I. Kísérletben leírtakéval. Kizárólag a 2 órás reperfúziót követően az állatok jobb oldali végtagjait az ellátó artérián keresztül perfúziósan fixáltuk elektron mikroszkópos vizsgálatok elvégése céljából (lásd később), a rutin szövettani mintavételre a bal végtagból került sor.

Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklipp, minden más tekintetben, az időbeli viszonyokat is figyelembe véve pontosan úgy jártunk el, mint a többi csoportban.

4.1.2. Korróziós preparátumok

Az I. Kísérletben korróziós preparátumok készítéséhez 10 állat fájdalommentes körülmények között anesztézia indukciót követően halálos dózisú anesztetikummal túlaltatásra került. A korróziós preparátumok készítésének célja a reziduális perfúziót biztosító kollaterális hálózatok feltérképezése volt. Az állatokon *post mortem* medián laparotómiát követően kipreparálásra került az aorta infrarenális szakasza, valamint az a. mesenterica superior és inferior. Az a. mesentericák eredésüknél való lekötötését követően, az aortát az infrarenális szakaszon 2 ligatúra között átvágásra került. Majd median torakotómián keresztül az aorta torakális szupra-avalváláris szakasza, az arcus aortae disztális része, valamint a jobb a. carotis communis kipreparálásra, majd és lekötötésre került. Mindezt követően a bal oldali a. carotis communisba, valamint a jobb oldali a. femoralisba polietilén kanülök kerültek behelyezésre, melyeken keresztül szimultán 6-6 ml eltérő színű, metakrilát alapú, többkomponensű gyantakeverék került injektálásra, az artériás érrendszer ábrázolása céljából (26. ábra). A gyantakeverék megszilárdulását követően a preparátumokat tömény 62-65°C-os kálium-hidroxid oldatban 3 napig emésztődtek, mely időszak alatt a lágy szövetek teljesen feloldódtak. Az öntvények forró vízben történő lemosását követően, melynek célja az esetleges



26. ábra: Korróziós preparátum makroszkópos képe

szennyeződések eltávolítása volt, a preparátumok megszárításra kerültek. A korróziós öntvények apróbb részleteinek kiértékelése sztereomikroszkóppal (Leica MZ75, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Svájc) történt. Kollaterálisnak azokat az érkepleteket tekintettük, melyek az alsó és a felső testfél között látható kapcsolat képeztek.

4.1.3. Mikrocirkuláció vizsgálata

A bal végtagon a reziduális perfúzió mértéke lézer Doppler áramlásmérővel (MOOR Instruments Ltd, London, UK; DRT4, kétcsatornás eszköz; $\lambda=632,8$ nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon lézer) került regisztrálásra. A műszer a kibocsátott lézer fény visszaverődésének Doppler elv alapján történő detektálásával működik. Az eszköz online adatrögzítéssel és számítógépes feldolgozással regisztrálja a mérőfej alatti kb. 1 mm³-es szövethengerben a kapillárisokban mért átlagos áramlást, vörösvértest koncentrációt és a hőmérsékletet.

A lézer Doppler áramlásmérő az iszkémia ideje alatt folyamatosan követte a mikrocirkulációs áramlást, valamint a mérőfej alatti szövet hőmérsékletét. A műszer által szolgáltatott áramlási adatok arbitrális skálán szerepelnek. Mivel az egyedek alap áramlásértékei eltérőek, az áramlási adatok, görbék összehasonlíthatósága érdekében munkacsoportunk által a görbék matematikai korrekciója történt:¹⁴⁰ a mért adatok állatonként egy százalékos relatív skálán lettek regisztrálva, illetve ábrázolva, ahol a beavatkozás előtti állapotban (iszkémia előtt) regisztrált alap áramlási alapérték a relatív skála 100-as értékét jelentette. ($T_{\text{flux}} = \text{flux} / \text{baseline} * 100$, ahol T_{flux} : korrigált áramlási érték, flux: mért áramlási érték, baseline: alapáramlás átlaga a végtagi iszkémia előtt mérve.) A fenti matematikai korrekciónak köszönhetően a különböző egyedeknél mért áramlási görbék összehasonlíthatóvá váltak. A mérések értékelése során további szempontok figyelembevételére történt: (1) Minden áramlási görbe egyedileg (is) kiértékelésre került. (2) Az azonos kísérleti csoportba tartozó egyedek áramlási értékeinek átlagolására, ezáltal egy átlagos áramlási görbe felállítására is sor került.

4.1.4. Fénymikroszkópos vizsgálatok

Minden állatból, kísérlettől és csoportbeosztástól függetlenül a bal oldali m. tibialis anterior azonos anatómiai lokalizációjából történt szövettani mintavétel. Az izomminták egyik része -80°C -on fagyasztva került tárolásra, enzimhisztokémiai vizsgálatok céljából, másik része 4%-os formalinban való 24 órás fixálást követően paraffinba került beágyazásra. A rutin szövettani vizsgálatok elemzése konvencionális fénymikroszkóppal (Olympus BX50 mikroszkóp Olympus DP70 kamerával felszerelve; Olympus Corporation, Tokió, Japán) történt 3-5 μm vastag metszeteken, hematoxillin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, ill. a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott. Az izomkárosodás szemikvantitatív kiértékelésére McCormack és munkatársainak „Fourfold divided frame counting” módszerét alkalmaztuk.⁶² Az izom teljes keresztmetszetéről 200x-os nagyítással 15 db fénykép készült, mely lefedte az izom teljes területét. Ezek után minden egyes fényképet 4 egyenlő részre osztottuk, majd a negyedeket sorba rendeztük. Random generátorral meghatároztuk a negyedek vizsgálati sorrendjét. Egy vizsgált negyedben minden izomrost beosztásra került sérült, vagy nem sérült csoportba. Sérültnek tekintettünk egy rostot, ha körvonala egyenetlen volt, vagy megszakadt; szerkezete, vagy színe inkonzisztens volt; intracellulárisan vakuólák voltak jelen; és/vagy a magok elkülönültek a rosttól. Mindegyik állatból összesen 300 izomrostot értékeltünk, hogy a megfelelő abszolút hibaszázalékot elérjük.

4.1.5. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Elektronmikroszkópos vizsgálatokat az első kísérlet során, valamint a második kísérletben 2 óra reperfüziót követően végeztünk. A jobb oldali végtagokat intraarteriális katéteren keresztül először meleg (37°C -os) 4%-os paraformaldehid oldattal töltöttük fel, majd ezt hideg 2%-os glutár-aldehid oldat infúziója követte összesen 30 percen keresztül. Az anterior tibialis izomból ezek után 1x1 mm-es szakaszok kerültek eltávolításra, melyeket 2%-os glutár-aldehid oldatban további 1 órán keresztül fixáltuk, ezt 1%-os ozmium-tetroxid oldatban történő további fixálás követte 1 órán keresztül. A mintákat dehidrált követően (növekvő alkohol sorban) aralditba

(Durcupan ACM Fluka, Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) ágyasztuk. Ultramikrotóm segítségével ultravékony szeletek készültek, melyeket uranil-acetáttal és vezércitráttal kontrasztoltuk, majd Hitachi H7500 transzmissziós elektronmikroszkóp (Hitachi Ltd, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk. Az elektron mikroszkópos képeket Olympus-SIS digitális kamera (Megaview II) segítségével készítettük.

A félvékony metszeteket toluidin-kékkel festve fénymikroszkóposan vizsgáltuk Zeiss Axiophot mikroszkóppal, mely AxioCam HRc digitális kamerával (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) volt felszerelve.

4.1.6. Izomrost életképesség vizsgálat

Az bal oldali m. tibialis anteriorból vett izommintákból 3 µm vastag fagyasztott metszetek készültek, melyeken NADH-tetrazolium reduktáz (NADH-TR) enzimhisztokémiai reakciót alkalmaztunk. A metszetek fénymentes körülmények között 30 percig 37°C-on nitroblue tetrazolium (1,8 mg/dl), NADH (15 mg/dl) és 0,05M TRIS puffer (pH 7,6) (Sigma) elegyében kerültek inkubálásra. A reakció során fel nem használt reagens aceton-oldat (30, 60, 90%) felszálló, majd leszálló koncentrációiban került eltávolításra a metszetekből. Ezt követően a fedést vízbázisú fedőanyaggal végeztük.

A festődési különbségek minimalizálása végett az összes minta feldolgozása azonos napon történt. A festés során a metszeteket azonosan időben, frissen készített, majd kiporciózott oldatban inkubáltuk.

Az életképesség kvantitatív meghatározása morfometriás szoftverrel történt (Leica QWin Pro, Leica Microsystems). 10 véletlenszerűen választott látótér került kifényképezésre metszetenként 600x-os nagyítással. A mérések során alkalmazott színtartomány meghatározása két, a szoftvert rendszeresen használó patológus által történt a fiziológiás kontroll állatok metszetei alapján. A finombeállítás célja a mitokondrium-festődés felismerésének, illetve a nem mitokondiumhoz köthető festődés kizárásának maximalizálása történt meg szemellenőrzés mellett. Az így meghatározott színtartomány helyességét minden iszkémiás csoportból származó véletlenszerűen kiválasztott minta vizsgálatával is összevetettük. Ezen eredmények figyelembevételével

a végső színtartományt a két patológus által jegyzett konszenzus határozta meg: R; G; B: 150; 105; 175 – 0; 0; 66 (27. ábra) Az elemzés során a szoftver által meghatározásra került a színtartományban található pixelek (tehát a keletkezett, mitokondrium specifikus festődés kiterjedése), melyet a képen található izomrostok összterületéhez arányítottunk.



27. ábra: A morfometriás program által pozitívnak tekintett színtartomány

Az első kísérlet során az összes rost életképességének (össz-életképesség) meghatározásán kívül elvégeztük az I-es (lassabb összehúzódásra képes, oxidatív) és a IIb (gyorsan összehúzódó, glikolitikus) típusú izomrostok életképességének szelektív meghatározását is. A rostokat a NADH-TR reakción alapuló festődési karakterisztikájuk alapján különítettük el: a halványan festődő rostokat a IIb, az erősen festődő rostokat I es típusba soroltuk, a korábban leírtaknak megfelelően.¹⁴¹ Az egyes egyedekhez tartozó eredmények átlagolásra kerültek. A végső eredményt kezeletlen kontroll állatok értékeihez viszonyítva adtuk meg százalékban.

4.1.7. Laboratóriumi vizsgálatok

A jobb kamrai punkcióból nyert vér 10 perces, szobahőmérsékleten történő centrifugálását (3000 rpm) követően, a hemolízis- és sejtmentes felülúszót folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd a további kémiai analízisek elvégzéséig -80°C-on tároltuk. A mérések a mintavételt követő 24 órán belül spektrofotometrián alapuló, klinikai kémiai laboratóriumi automatán (Beckman Coulter AU480/2011, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, Amerikai Egyesült Államok), rutin tesztek felhasználásával történtek. A szérum kreatin-kináz (CK, poszt kondicionálás vizsgálata kapcsán), illetve laktát-dehidrogenáz (LDH), kálium és TNF- α szintjei (különböző kirekesztések összehasonlítása kapcsán) kerültek meghatározásra a különböző időpontokban.

4.1.8. Nedvességtartalom meghatározás

Az izomszövet nedvességtartalma a jobb oldali alsó végtag megmaradt izomtömegéből került meghatározásra. Az izmok tömegét a kivételt követően azonnal meghatároztuk (nedves tömeg), majd az izmokat +80°C-os környezetbe helyeztük 3 napig száradni, amíg egy állandó súlyt el nem értek (száraz tömeg). Ezt követően az kiszáradt izmok tömege újra meghatározásra került. A következő képlet segítségével a mért tömegekből az izom nedvességtartalma meghatározható, melyet százalékban adunk meg: $(\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}) / \text{nedves tömeg} * 100$

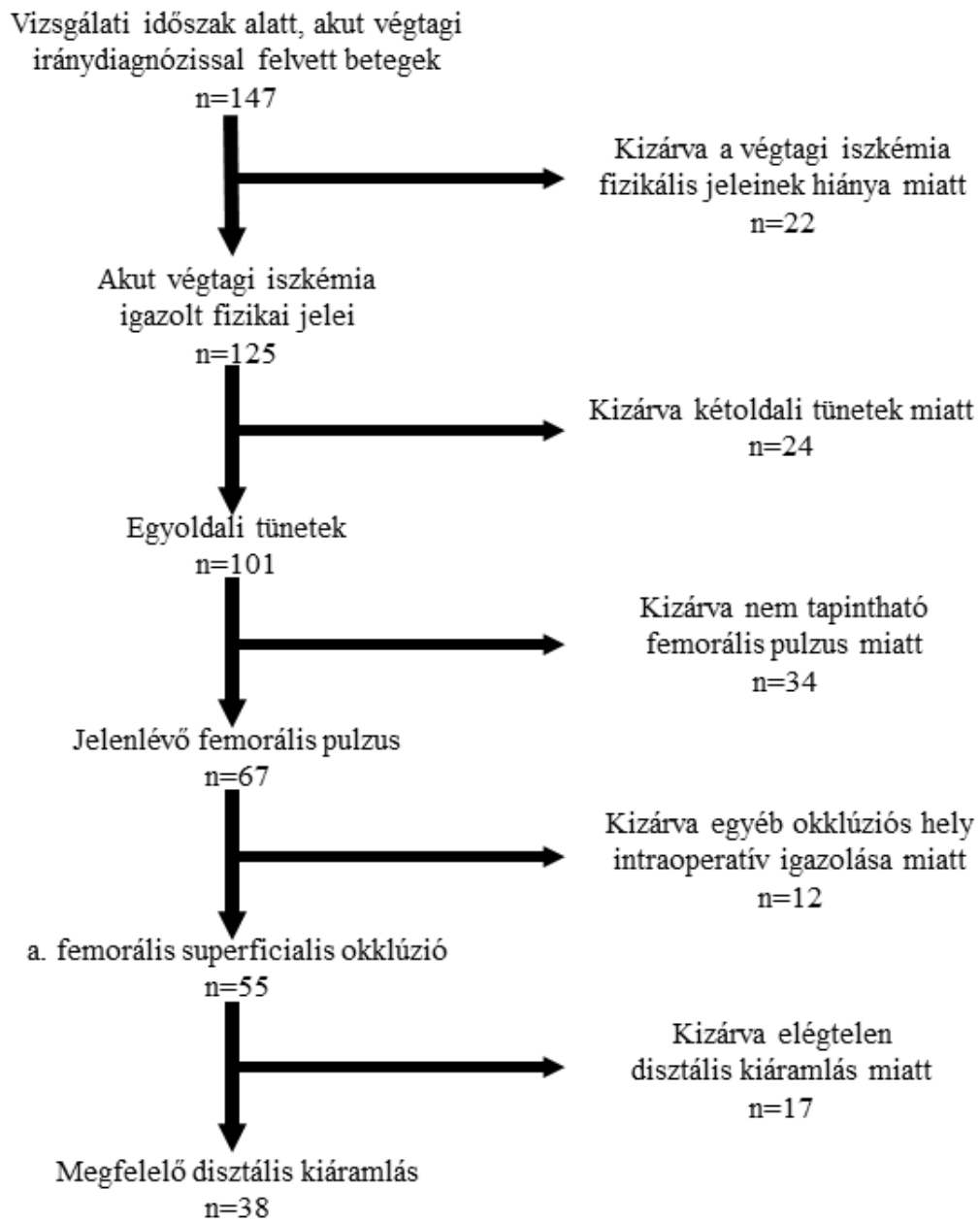
4.2. Klinikai vizsgálatok

4.2.1. Etikai háttér

Vizsgálataink során a Helsinki Deklaráció szerint elvárt követelményeknek megfelelően jártunk el. Munkánkat a 91/2011 számú Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai által kiadott engedély alapján végeztük, mely az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának pozitív állásfoglalását erősíti meg.

4.2.2. Beválasztási kritériumok

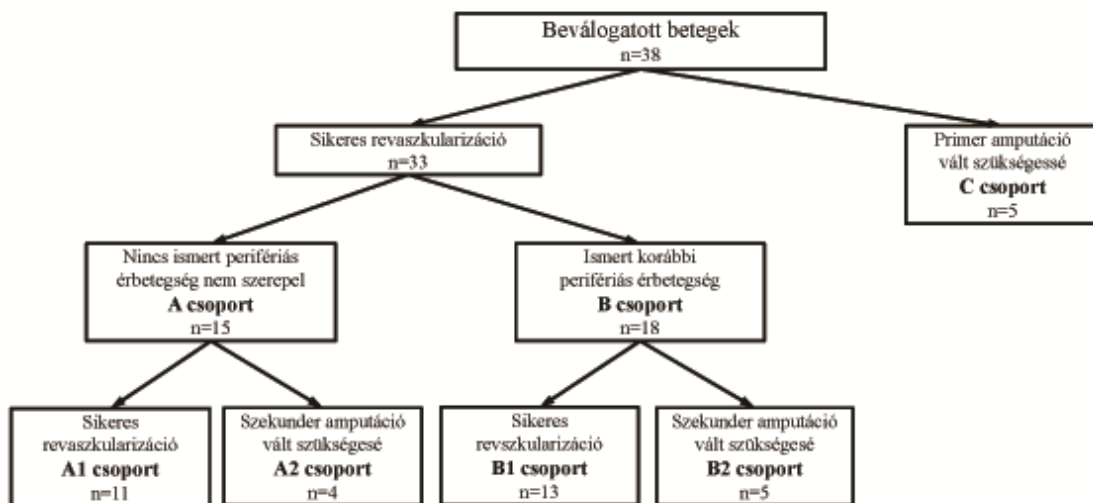
A vizsgálatba a 2011. június 1-je és 2012. június 1-je közötti időszakban a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikára beutalt, akut arteria femoralis superficialis elzáródással jelentkező betegeket választottuk be. Az ettől proximális és/vagy disztális okklúzióval rendelkező betegek, valamint a bilaterális elzáródásos esetek kizárásra kerültek. További kizárási kritérium volt a műtét során észlelt nem kielégítő disztális érstatusz (28. ábra).



28. ábra: A beteg-beválasztási folyamat

4.2.3. Betegpopuláció és csoportbeosztás

A vizsgálati időszak alatt a Klinikán 147 beteg került felvételre akut végtagi iszkémia iránydiagnózissal, melyek közül 38 beteg felelt meg a bevásztási kritériumoknak (28. ábra). Ezen 38 beteget (átlagéletkor: $60,7 \pm 9,5$ év) három főcsoportra osztottuk. Az „A” csoportba kerültek besorolásra azon betegek (15 beteg, 39,5%), kiknek anamnézisében megelőző érbetegség nem szerepelt, valamint az iszkémiás károsodás fizikális jelei alapján a primer revaszkuarizáció megkísérélhető volt. A „B” csoportban (18 beteg, 47,4%) lévő betegek anamnézisében ismert perifériás érbetegség szerepelt, valamint az iszkémiás károsodás jellege lehetővé tette a primer revaszkuarizációt. A „C” csoportba azon betegek kerültek, kiknél a revaszkuarizáció a fizikális jelek alapján nem volt kivihető (5 beteg, 13,1%), ezen betegek primeren amputációra szorultak. Az A és B csoportokat a betegség sebészeti megoldásának rövidtávú kimenetele alapján további alcsoportokra osztottuk. Az 1. alcsoportokba azon betegek kerültek, kiknél a revaszkuarizáció sikeres volt, a végtag keringése helyreállt (A1: 11 beteg, 28,9%; B1: 13 beteg, 34,2%), míg a 2. alcsoportokba azon betegek kerültek, kiknél a sebészeti revaszkuarizáció sikertelen volt, ezen esetekben szekunder módon amputáció vált szükségessé (A2: 4 beteg, 10,6%; B2: 5 beteg, 13,2%; 29. ábra).



29. ábra: Csoportbeosztás

4.2.4. Beavatkozások

A betegek az akut artériás elzáródás fizikális diagnózisát követően protokoll szerint 5000 NE Na-heparint kaptak bólusban. Ezt követően a műtéti megoldás kezdetéig minden beteg 1000 ml Salsol, 200 mg pentoxifillin és 80 mg papaverin kezelést kapott intravénásan, 1000 NE/óra Na-heparin intravénás adagolása mellett. A revaszkularizációt műtétileg, Fogarty szerint végeztük az A csoportban,¹³⁸ míg a B csoportban femoralis thrombendarteriectomiát végeztünk. Az okklúzió pontos magassága és a disztális kiáramlás épsége intraoperatíván került meghatározásra. Mintavételre a m. tibialis anteriorból (iszkémiás minta), illetve a m. pectineusból (kontroll minta) került sor (lásd alább) a revaszkularizációt, illetve az amputációt megelőzően. A mintavétel során az izmok középső részéből 2x1 cm-es szövetdarabot távolítottunk el. Azon betegeknél, kiknél a revaszkularizációs eljárás sikertelen volt újabb mintát vettünk az amputált végtagból is. Minden esetben femorális szintű amputációra került sor.

4.2.5. Adatgyűjtés

A kísérleti protokoll szerint felvételnél regisztráltuk a betegek demográfiai adatait (nem, kor), anamnézisének, különös tekintettel az összefüggő komorbiditásokra (pitvarfibrilláció, trombózis, perifériás érbetegség, szívbetegség, carotis rendszeri és/vagy cerebrovaszkuláris betegség), valamint operáció alatt gyűjtött izomminták fény és izomrost össz-életképesség vizsgálatát végeztük el.

4.2.6. Vizsgálatok

4.2.6.1. Fénymikroszkópia

A revaszkularizációt (az A1, B1, illetve A2, B2 csoportokban), illetve az amputációt (az A2, B2, illetve C csoportokban) megelőzően gyűjtött m. pectineus és m. tibialis anterior mintákat 4%-os formalin oldatban 1 napon keresztül fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Ezt követően 3 µm vastag kereszt- és hosszmetseti

preparátumokat képeztünk, melyeket hematoxillin-eozinnal festettünk meg, majd Olympus BX50 mikroszkóp (Olympus) segítségével vizsgáltunk.

4.2.6.2. Életképesség

Az életképesség vizsgálatok előkészítésénél minden tekintetben a 3.1.6. fejezetben részletezetteknek megfelelően jártuk el. Humán vizsgálatunkban a korábbi kísérletes eredményeinkre hivatkozva az izomrostok szelektív életképességének vizsgálatát nem végeztük el, az izomrostok össz-életképességét vizsgáltuk. A kiértékelés során az egyes betegek iszkémiás m. tibialis anterior izmok életképesség értékeit a kontroll m. pectineus izom értékeihez képest adtuk meg százalékban.

4.2.7. Utánkövetés

A műtétet követően a betegek 10 napig testtömeg kilogrammnak megfelelő dózisú alacsony molekulásúlyú heparin terápiában részesültek, melyet 100 mg Aspirin/nap terápia követett fél éven keresztül. Jelen vizsgálatban 30 napos utánkövetést végeztünk, hosszú távú követés nem szerepelt a céljaink között. A posztoperatív 30. napon megtörtént a végtagok állapotának értékelése.

4.2.8. Vizsgálati végpont

A vizsgálat elsődleges végpontját a végtag károsodás mértékének értékelése jelentette, mind hisztológiailag, mind életképesség vizsgálatok alapján. A vizsgálat fő célja volt a két említett eljárás által nyújtott eredmények összevetése, az izomrost életképesség hatékonyságának megállapítása céljából.

4.3. Statisztikai feldolgozás

A statisztikai vizsgálatokat IBM SPSS Statistics 20.0 szoftver (IBM Corporation, Armonk, NY, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük. A táblázatban a mérések eredményét a mért értékek átlagával és a standard deviáció (\pm SD) megadásával fejeztük ki. A statisztikai elemzések során Shapiro-Wilk teszt segítségével vizsgáltuk a minták normál eloszlását. Ennek megfelelően az elemzés során egy-, illetve kétutas ANOVA-t alkalmaztunk a csoportok közötti, illetve csoportokon belüli különbségek kimutatására, Bonferroni *post hoc* analízissel. A humán vizsgálatok során végzett eloszlásanalízishez Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk. Az átlagértékek, illetve varianciák közötti különbségeket $p < 0,05$ konfidencia intervallum esetén értékeltük szignifikáns különbségként. Az adatok grafikus megjelenítését Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Amerikai Egyesült Államok) szoftver segítségével végeztük el.

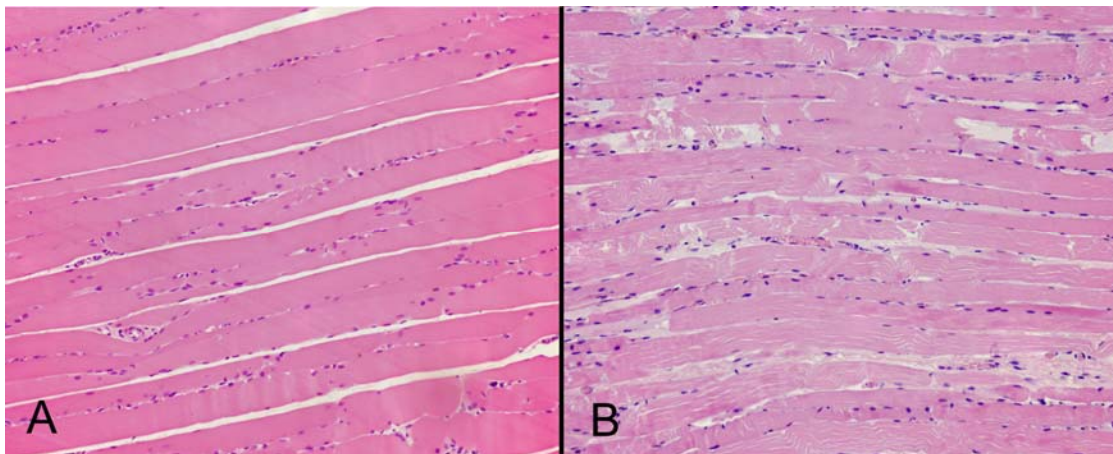
5. EREDMÉNYEK

5.1. I. Kísérlet: A reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata

5.1.1. Az aortaokklúzió és a tourniquet okozta izom iszkémia összehasonlítása

5.1.1.1. Szövettani vizsgálatok

Az aorta okklúziós csoportban a 3 órás iszchémiát követő 4 órás reperfúzió közepes mértékű változásokat okozott az izomszövetben (30/A. ábra). A metszeteken néhol rhabdomiolitikus rostok voltak megfigyelhetők, intracelluláris vakuólákkal és a rostok integritásának elvesztésével. A tourniquet csoportban ezzel szemben ugyanezen időtartamok alkalmazása mellett jelentős mértékű miocitolízis volt észlelhető az szövettani metszeteken (30/B. ábra). A nem nekrotikus izomrostokban is a károsodás jelei láthatóak, intracelluláris ödémával és vakuolizációval.



30. ábra: **Reprezentatív szövettani metszetek a reziduális perfúzió jelentőségének vizsgálata során.** A: Az aorta okklúziós csoport metszetein enyhe izomkárosodás látható; B: A tourniquet csoportban a károsodás mértéke jelentősebb. Hematoxillin-eosin festés, eredeti nagyítás: 200x

5.1.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban nekroenzim vizsgálatok során mind a szérumban CK (3567 ± 318 U/l), mind az LDH (2213 ± 928 U/l) enzimszintjei tekintetében a tourniquet csoportban szignifikánsan magasabb (rendre $p < 0,001$ és $p < 0,05$) értékeket kaptunk, mint az aorta okklúziós csoportban (rendre 822 ± 140 és 1075 ± 144 U/l).

A szérum kálium szintjeiben hasonló tendenciát figyelhattunk meg: a tourniquet kirekesztés szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) ionszinteket okozott ($7,79 \pm 0,96$ mmol/l), mint az aorta okklúzió ($6,98 \pm 0,57$ mmol/l).

A szérum TNF- α szintek az előbbi paraméterekhez hasonlóan változtak (tourniquet kirekesztés: $207,1 \pm 30,9$ pg/ml; aorta okklúzió: $52,5 \pm 10,4$ pg/ml; $p < 0,001$).

5.1.1.4. Izomrost-életképesség vizsgálat

Az aorta okklúzió az izomrostok össz-életképességének nagyfokú csökkenését idézte elő ($45,13 \pm 7,51\%$). A tourniquet kirekesztés azonos iszkémiás-reperfüziós idők alkalmazása mellett szignifikánsan ($p < 0,001$) nagyobb mértékű károsodást okozott ($7,91 \pm 3,25\%$) az aorta kirekesztéshez képest.

5.1.2. Korróziós öntvények

A korróziós preparátumokon az alsó és felső testfél között a következő artériás kapcsolatok váltak láthatóvá az aorta infrarenális szakaszának kirekesztését követően (31., 32. ábra):

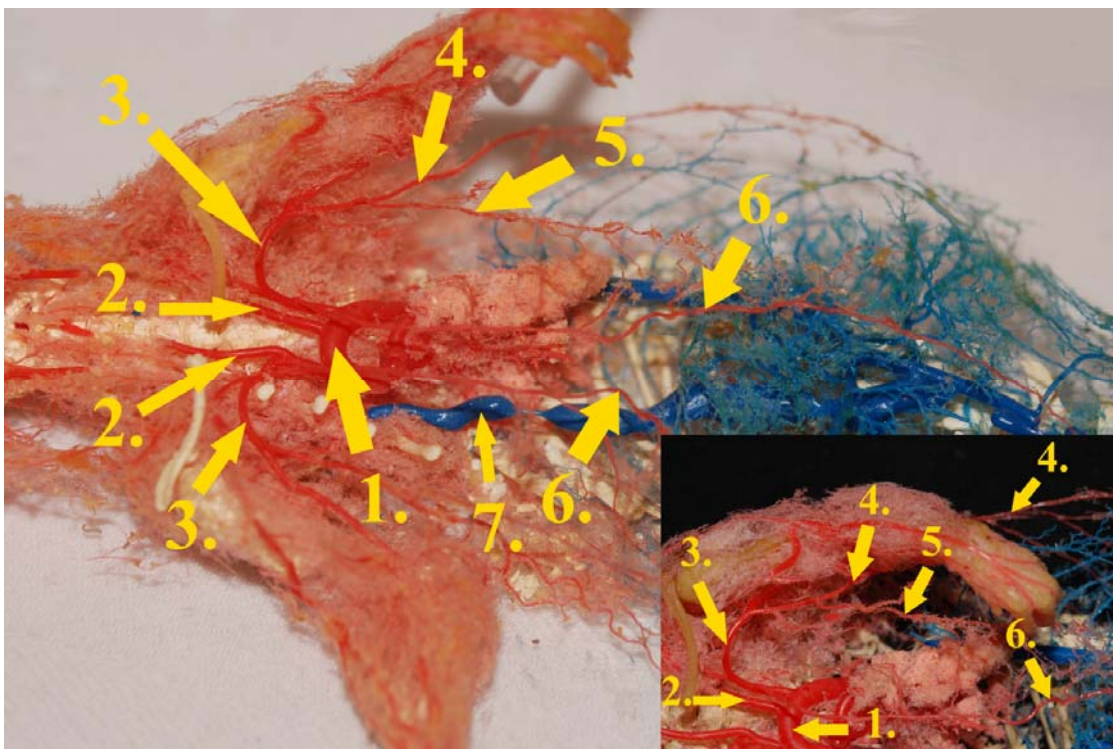
1. Mediális és laterális kollaterális artériák, melyek az a. iliaca externával anasztomizálnak: (a) Egy mediális kollaterális artéria, mely az alsó interkostális és szubkostális artériákból ered. (b) Egy laterális kollaterális, melynek eredési helye az a. thoracodorsalis és az a. thoracalis lateralis között váltakozott. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy az előbb említett két artéria között összeköttetések voltak megfigyelhetők az állatokban a laterális szegmentális artériás hálózaton keresztül.
2. Perforáns artériák, melyek az a. thoracica internából szegmentálisan eredve anasztomizálnak az a. thoracodorsalisszal, valamint lateralis thoracalis artériákkal.
3. A dorsolaterális caudalis vénák két társuló artériával rendelkeznek, mindkét oldalon, melyek az a. thoracica interáncból erednek. Ezen artériák az a. sacralis medialisszal állank kapcsolatban szegmentális ágakon keresztül a farok egész hosszában.
4. Az a. epigastrica superior, mely az a. thoracica interna folytatása.

5. A comb anterior és mediális felszínén lévő artériás rendszer, mely a laterális kollaterális artériából ered.

6. A bal és jobb iliolumbális artériák nagy átmérőjű ágakkal anasztomizálnak a comb anterior felszínén lévő artériás hálózattal.

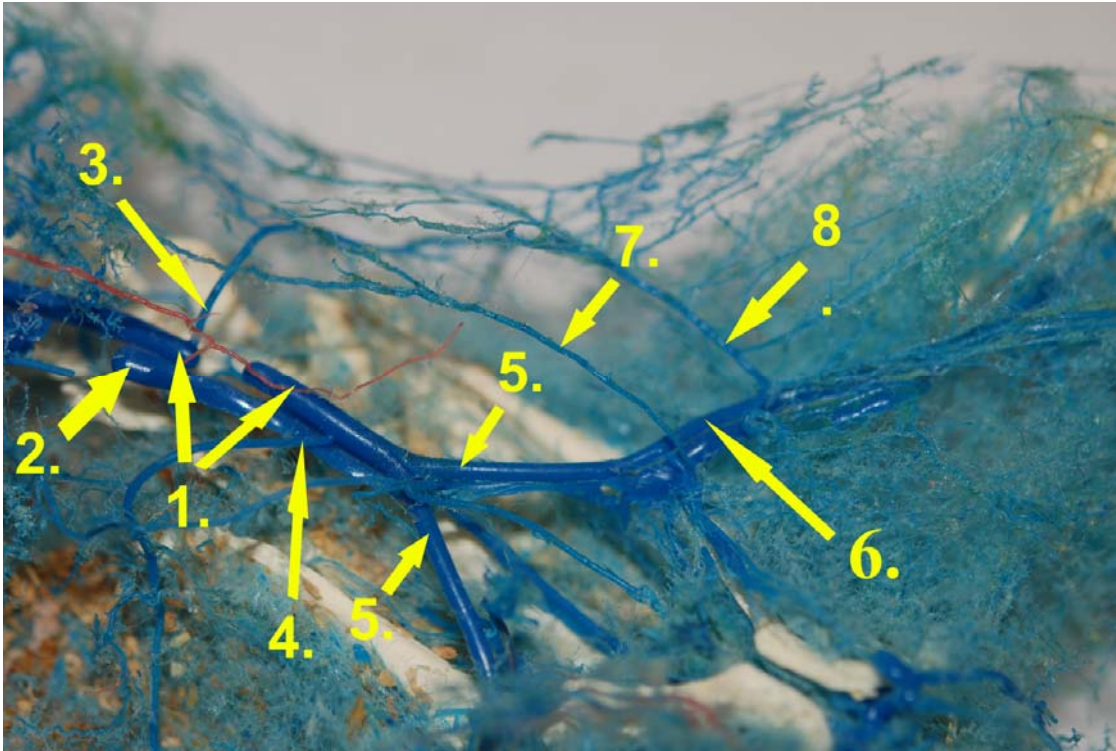
7. Nem sokkal az abdominális artériából való eredését követően az a. sarcalis media a gerincvelő felé artériás ággal rendelkezik. Ez az artéria ezek után két kisebb érre válik ketté a lumbális csigolyák előtt, majd a gerinccsatornába lépve anasztomizál a durális érhálózattal.

Az ismertetett artériák mindegyik vizsgált állatban fellelhetőek voltak.



31. ábra: A felső testfélből eredő kollaterálisok.

1. arcus aortae 2. a. carotis communis 3. a. subclavia 4. a. thoracodorsalis 5. a. thoracalis lateralis 6. a. epigastrica superior 7. vena cava inferior



32. ábra: Az alsó testfélből eredő kollaterális hálózat.

1. aorta abdominalis 2. vena cava inferior 3. a. iliolumbaris sinistra 4. a. iliolumbaris dextra
5. a. iliaca communis 6. a. iliaca externa 7. a. collateralis medialis 8. a. collateralis lateralis

5.2. II. Kísérlet: Az izomrost életképesség meghatározás vizsgálata

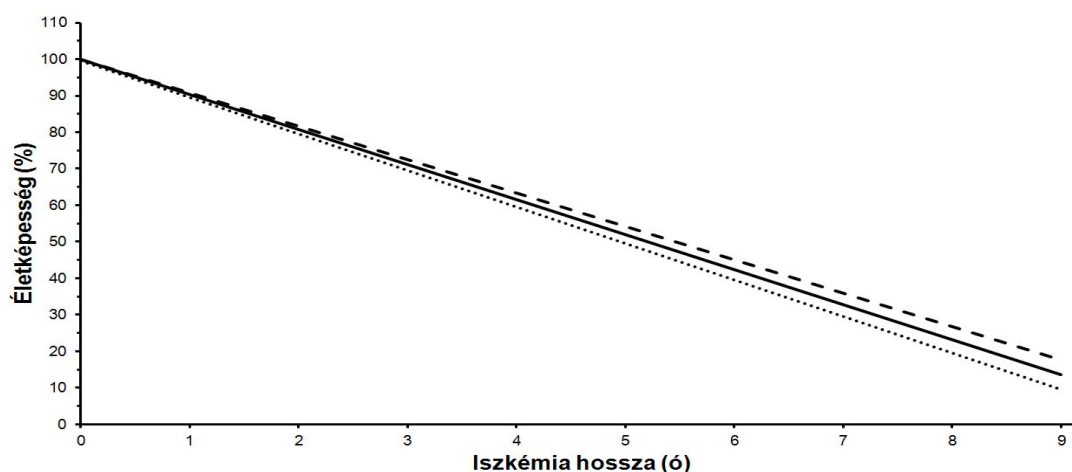
5.2.1. Mikrocirculáció vizsgálata

A mikrocirculációs áramlás az iszkémia teljes ideje alatt regisztrációra került mindegyik állatban, annak eldöntésére, hogy a kísérleti modell képes-e megfelelően alacsony, stabil, konstans áramlást létrehozni. Az okklúzió felhelyezése után az áramlás az alapérték $17,3 \pm 7,3\%$ -ára esett vissza. Az áramlás a kísérlet során szignifikáns variációt nem mutatott az iszkémia alatt. A 9. óra iszkémia végén mért értékek ($16,5 \pm 9,2\%$) sem tértek el szignifikánsan az iszkémia kezdetén mértéktől ($p > 0,05$). A csoportok között az iszkémia alatti áramlás tekintetében szignifikáns variáció nem volt kimutatható, az áramlás minden állatban 30% alatt maradt, mely arra utal, hogy az infrarenális aortakirekesztés jelentős iszkémia létrehozására képes.

5.2.2. Iszkémiás károsodás vizsgálata

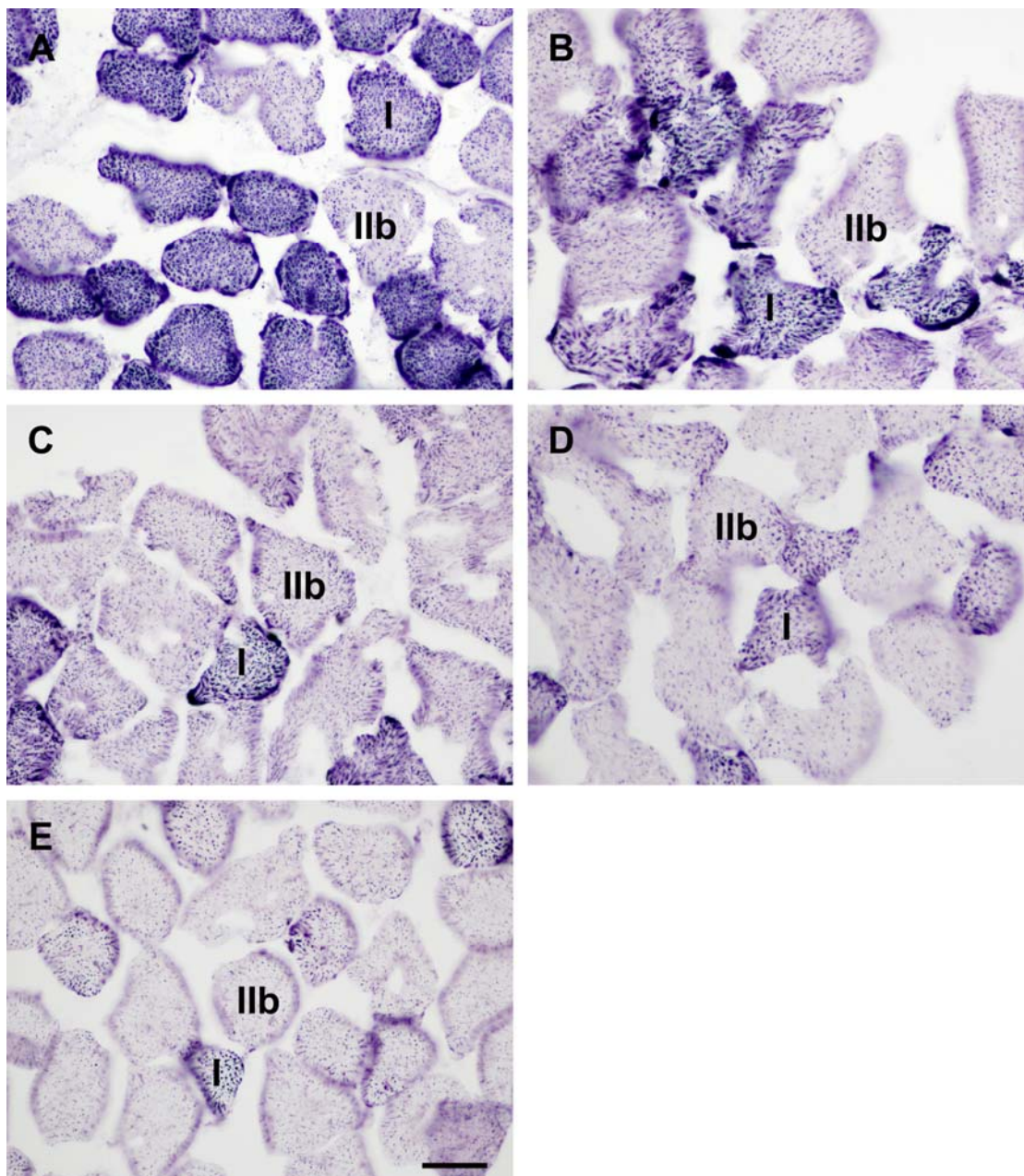
5.2.2.1. Izomrost-életképesség vizsgálat

Az izomrostok össz-életképessége az iszkémia hosszával lineárisan csökkent (Fiziológiás kontroll állatok: $100,0 \pm 3,9\%$; 4 órás iszkémiát követően: $60,5 \pm 5,6\%$; 6 óra után: $43,8 \pm 5,4\%$; 8 órát követően: $24,3 \pm 5,7\%$; majd a 9. óra végén: $12,1 \pm 2,9\%$; 33. ábra folytonos vonal). Az I-es és a IIb típusú rostok esetében is hasonló karakterisztika volt megfigyelhető (I-es típusú rostok esetében, rendre: $100,0 \pm 5,7\%$, $61,9 \pm 4,3\%$, $46,4 \pm 4,2\%$, $29,1 \pm 3,5\%$, $15,5 \pm 3,9\%$ 33. ábra szaggatott vonal; a IIb típusú rostok esetében, rendre: $100,0 \pm 4,1\%$, $58,8 \pm 5,9\%$, $39,5 \pm 5,2\%$, $20,1 \pm 6,2\%$, $9,5 \pm 3,1\%$; 33. ábra pontozott vonal). Az egymást követő időpontok között szignifikáns különbségeket találtunk ($p < 0,001$) mindhárom mért életképesség tekintetében. Az I-es típusú rostok nagyobb károsodást szenvedtek a meghatározott életképesség értékek alapján, mint a IIb típusúak, mely különbség 6 óra iszkémia elteltével vált szignifikánssá ($p_{60} < 0,05$; $p_{80} < 0,01$; $p_{90} < 0,05$). Az adatok feldolgozása során erős, szignifikáns korreláció igazolódott az iszkémia hossza, valamint a kapott életképesség értékek között mindhárom vizsgált életképesség esetén (össz-életképesség: $r = -0,989$; $r^2 = 0,978$; $p < 0,001$, I-es típusú rostok: $r = -0,990$; $r^2 = 0,979$; $p < 0,001$; IIb típusú rostok: $r = -0,989$; $r^2 = 0,978$; $p < 0,001$). Az izomrostok életképesség meghatározásának alapjául szolgáló reprezentatív szövettani képeket a 34. ábra mutatja be.



33. ábra: A különböző izomrostok életképessége

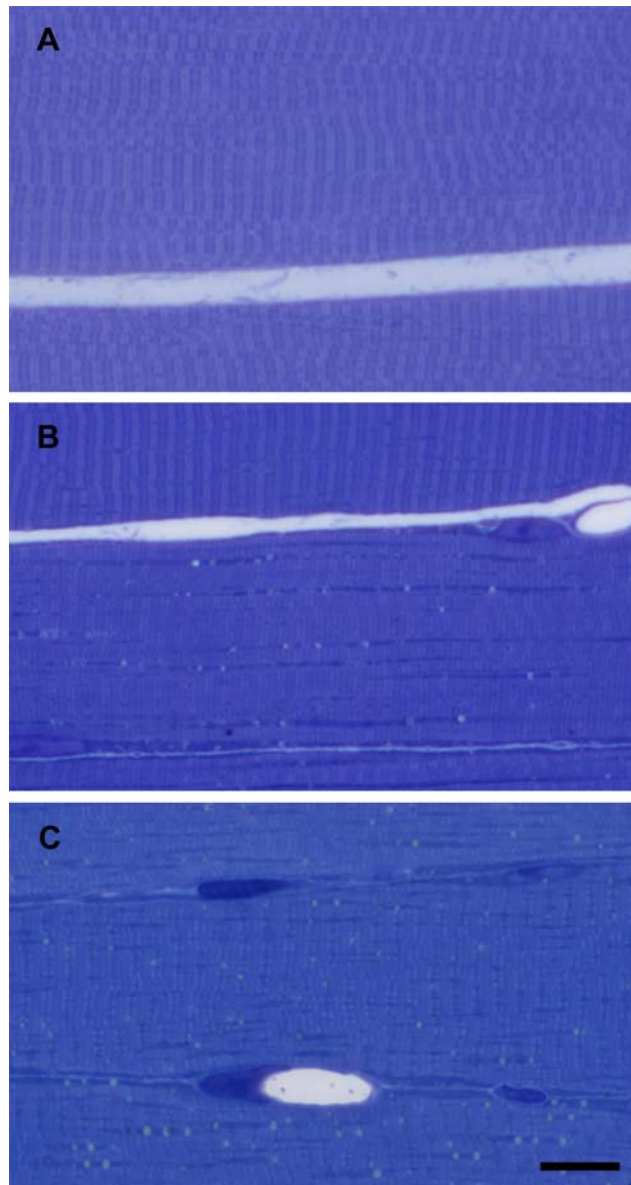
Szaggatott vonal: az I-es típusú rostok életképessége; pontozott vonal: a IIb típusú rostok életképessége; folytonos vonal: az izomrostok össz-életképessége.



34. ábra: **NADH-tetrazólium reduktáz festett metszetek az iszkémiás károsodás vizsgálata során**
 Az ábra a m. tibialis anteriorból nyert izomszövet reprezentatív képeit mutatja NADH tetrazolium reduktáz festett metszeteken a fiziológiás kontroll állatokban (A), valamint 4 (B), 6 (C), 8 (D), illetve 9 órás hosszúságú infrarenális aortakirekesztést követően, reperfüzió nélkül. Típusos I-es, illetve IIb típusú rostok a képek kiemelésre kerültek I, illetve II jelöléssel. Bar: 35 mm.

5.2.2.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok félvékony metszeteken

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az izomrost életképesség által mutatott értékek megfelelnek-e a valódi károsodásnak toluidin kék festett félvékony metszeteken vizsgálatuk a szövettani károsodást. A kezeletlen állatok metszetein izomkárosodás jelei nem voltak megfigyelhetők (35/A. ábra). 4 és 6 órás iszkémia a félvékony metszeteken patológiás elváltozást nem okozott. 8 óra hosszúságú iszkémia a rostok festődésének felerősödésével járt. A rostok belsejében, elszórtan, kis homogén bennékű, változó denzitású cseppek jelek meg, főként a mitokondriumban gazdag – feltehetőleg vörös – izomrostokban (35/B. ábra). 9 órás iszkémiát követően a rostok festődése fokozódott az előző időpillanathoz képest, elszórtan egy-egy hiperkontrakciót mutató izomrost is látható volt. Egyes rostokban a harántcsíkolt festődése megváltozott. A 8 órás iszkémiát követően is jelenlévő homogén cseppek mennyisége növekedett, 9 óra iszkémiát követően már a legtöbb rostban



35. ábra: **Reprezentatív félvékony metszetek az iszkémiás károsodás vizsgálata során**

A: a fiziológiás kontroll állatokban károsodás nem látható;

B: 8 órás iszkémiát követően a rostok belsejében, elszórtan, kis homogén bennékű, változó denzitású cseppek jelek meg;

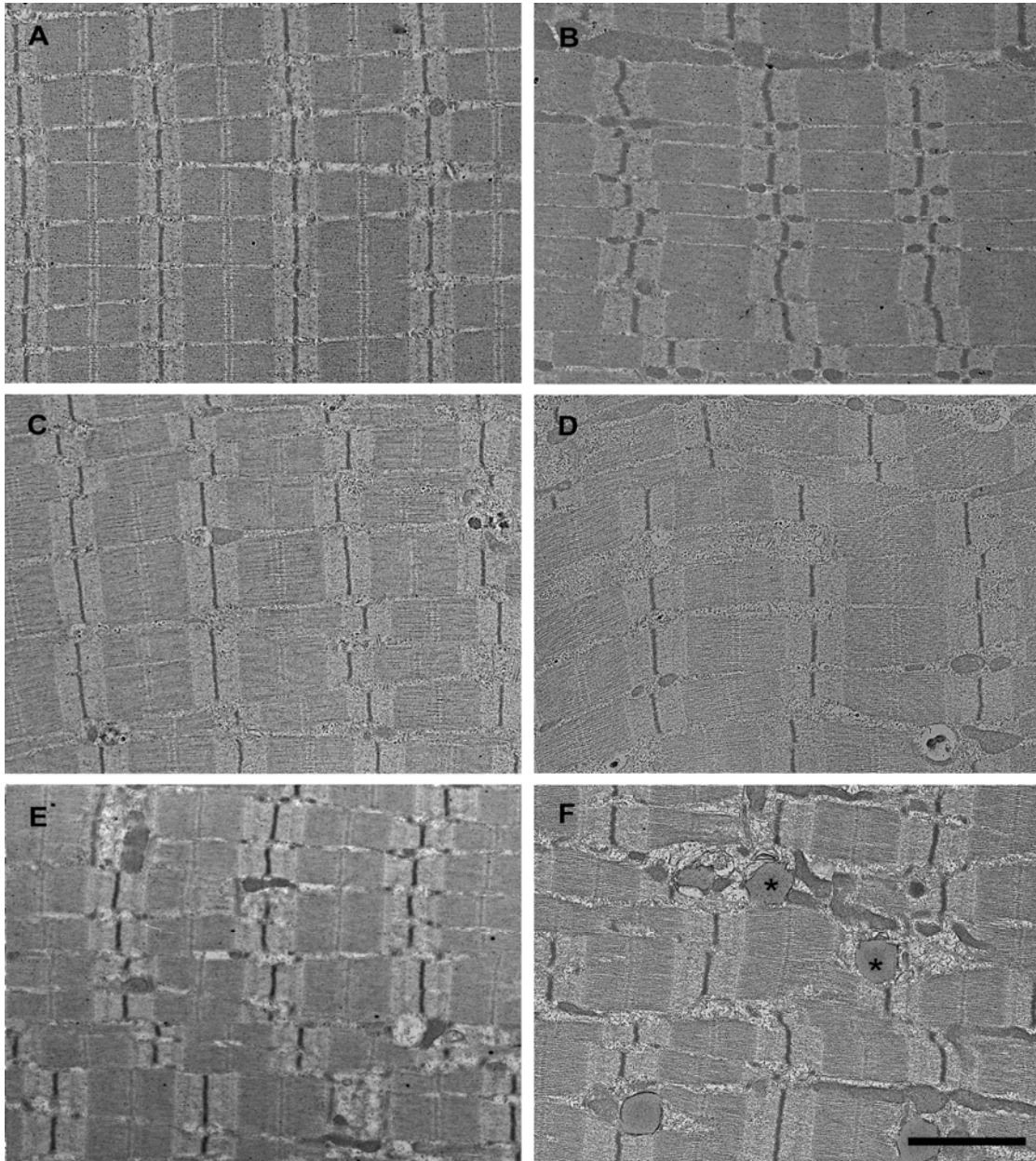
C: 9 órás iszkémiát homogén cseppek mennyisége növekedett az előző időpillanathoz képest, valamint elszórtan egy-egy hiperkontrakciót mutató izomrost is látható volt.

Festés: toluidin-kék, bar: 20 μ m.

előfordultak (35/C. ábra). A mitokondriumban gazdag rostok azonban sokkal több homogén cseppet tartalmaztak, mint a mitokondriumban szegények.

5.2.2.3. Elektronmikroszkópia

A fiziológiás kontroll állatok elektron mikroszkópos képe nem mutatott károsodást (36/A-B. ábra). A 8 órás hosszúságú iszkémia a mitokondriumokban közepes mértékű duzzadást okozott. Egyes mitokondriumok helyén lipid-szerű homogén bennéki cseppek voltak megfigyelhetők, főként a mitokondriumban gazdag rostokban, a cseppeket elektrondenz szegély vette körül (36/C-D. ábra). 9 órás iszkémia a mitokondriumok alakjának deformitását idézte elő, néhol a mátrixban flokkulens denzitások voltak megfigyelhetők. A mitokondriumok nagyobb része a diszrupció jeleit mutatta. A 8 órás iszkémiás csoportban látott lipid-szerű cseppek előfordulása, 9 órás iszkémiát követően megsokszorozódott, valamint már a szubsarkolemmális mitokondriumok között is előfordultak. A metszeteken megfigyelhető volt még a szarkoplazmatikus retikulum közepes fokú duzzanata, néhol dezorganizációja. A leírt változások már nemcsak a mitokondriumban gazdag, hanem a mitokondrium-szegény rostokban is láthatóvá váltak, ugyan kisebb mértékben (36/E-F. ábra).



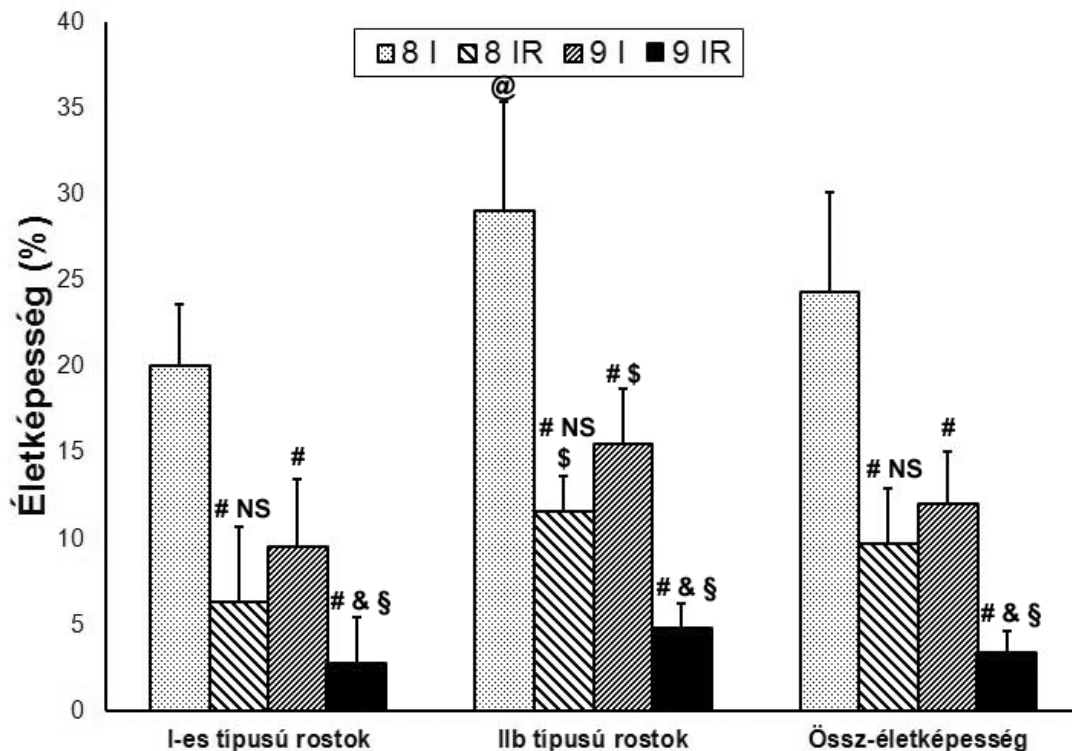
36. ábra A mitokondriumban szegény (A, C, E), illetve a mitokondriumban gazdag (B, D, F) izomrostok elektronmikroszkópos képe változó hosszúságú iszkémiás időket követően

A, B: A fiziológiás kontroll állatok elektron mikroszkópos képe nem mutatott károsodást. C, D: A 8 órás hosszúságú iszkémia a mitokondriumokban közepes mértékű duzzadást okozott. Egyes mitokondriumok helyén lipid-szerű homogén bennkü cseppek voltak megfigyelhetők, főként a mitokondriumban gazdag rostokban (D), a cseppeket elektrondenz szegély vette körül. E, F: 9 órás iszkémia a mitokondriumok alakjának deformitását idézte elő, néhol a mátrixban flokkulens denzitások voltak megfigyelhetők. A mitokondriumok nagyobb része a diszrupció jeleit mutatta. A lipid-szerű cseppek előfordulása megsokszorozódott akorábbi időpillanathoz képest, valamint már a szubsarkolemmális mitokondriumok között is előfordultak. A metszeteken megfigyelhető volt még a szarkoplazmatikus retikulum közepes fokú duzzanata, néhol dezorganizációja. A leírt változások már nemcsak a mitokondriumban gazdag (F), hanem a mitokondrium-szegény rostokban (E) is láthatóvá váltak, ugyan kisebb mértékben. Bar: 2 μ m.

5.2.3. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás vizsgálata

5.2.3.1. Izomrost életképesség

Az izomrost-életképesség szignifikánsan lecsökkent a 8IR csoportban a reperfúzió nélküli (8I) csoporthoz képest ($p < 0,001$) mindegyik vizsgált paraméter tekintetében. 9 órás iszkémia esetében hasonló változások voltak megfigyelhetők. ($p < 0,001$; 9I vs. 9IR). A 8IR és a 9I csoportok között azonban szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p > 0,05$) egy rosttípus esetében sem, valamint az össz-életképesség tekintetében sem. Az I-es típusú rostok 8 órás iszkémiát követő 2 órás reperfúzió hatására szignifikánsan nagyobb ($p < 0,05$) életképesség-csökkenést mutattak, a IIb típusú rostokhoz képest (37. ábra).

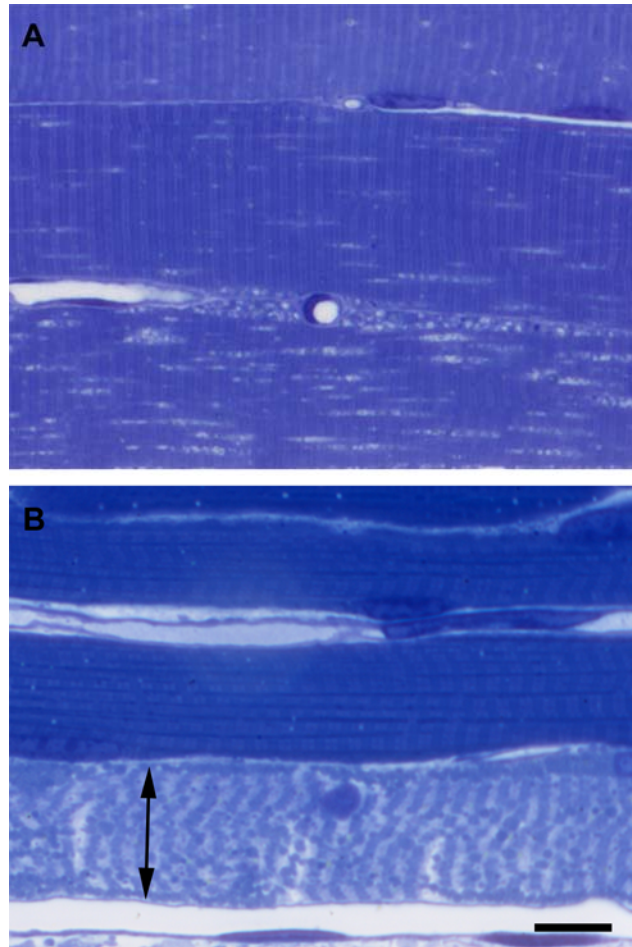


37. ábra: A különböző izomrostok életképessége iszkémia-reperfúziót követően

$p < 0,001$ 8I csoporthoz képest; & $p < 0,05$ a 8IR csoporthoz képest; \$ $p < 0,001$ a 9I csoporthoz képest; NS $p > 0,05$ a 9I csoporthoz képest; \$ $p < 0,05$ a IIb típusú rostokhoz képest; @ $p < 0,001$ a IIb típusú rostokhoz képest; $n = 6$ csoportonként.

5.2.3.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata

A 8 órás iszkémiát követő 2 órás reperfúzió jelentős morfológiai változásokat okozott az izmokban. A metszeteken a homogén bennékű cseppek a legtöbb izomrostban nagy mennyiségben fordulnak elő, valamint az izomrostok szerkezete kissé fellazult (38/A. ábra). 9 órás iszkémiát követő reperfúzió jelentős mértékű nekrozist okozott az izomszövetben (38/B. ábra). A rostok több mint a fele elhalt. A nem nekrotikus rostok is súlyos károsodást jeleznek, ami hasonló a 8IR csoportban tapasztaltakkal.



38. ábra: **Reprezentatív félvékony metszetek iszkémiás reperfúziós károsodást követően**

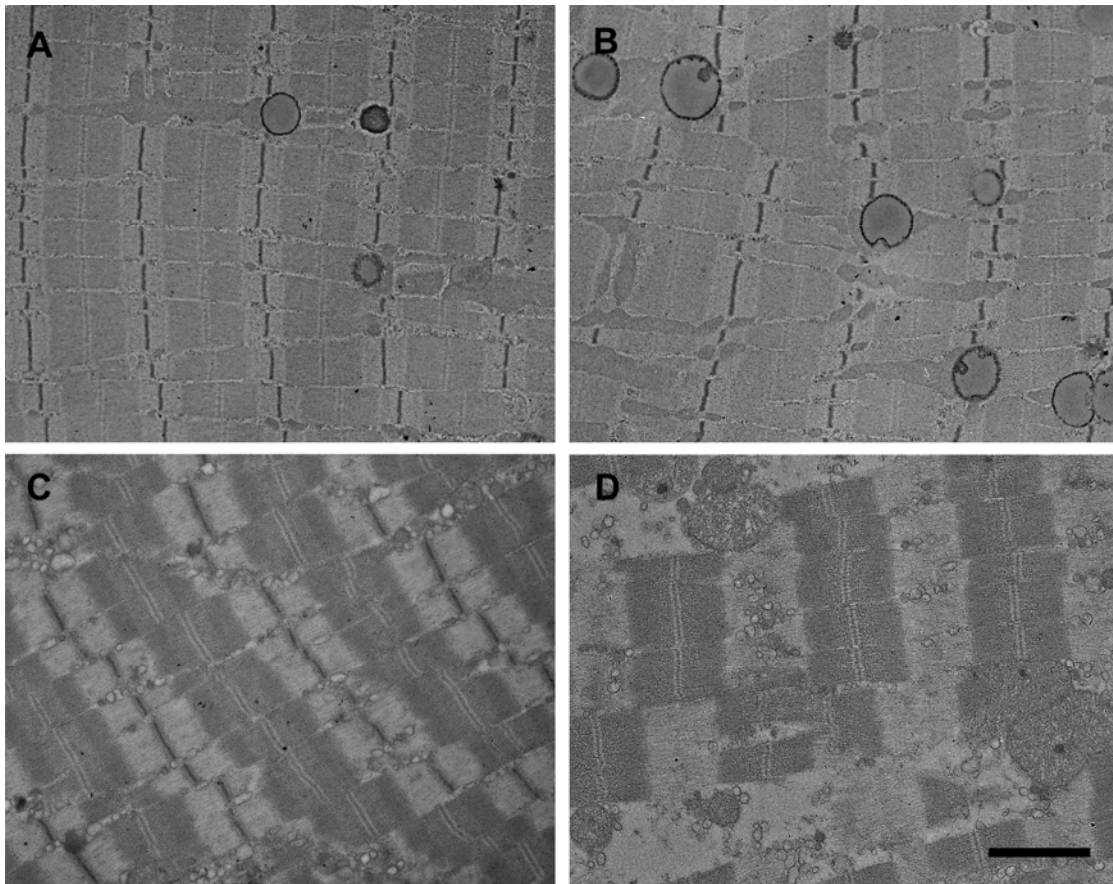
A: 8 órás iszkémiát valamint 2 óra reperfúziót követően az izomrostok szerkezetének fellazulását, valamint a homogén bennékű cseppek mennyiségének jelentős növekedését figyelhetjük meg;

B: 9 órás iszkémiát követő reperfúzió a rostok többségében nekrozist idézett elő. A nem nekrotikus rostokban a károsodás mértéke hasonló az előző csoportban láthatókkal. Nyíl: nekrotikus izomrost.

Festés: toluidin-kék, bar: 20 μ m.

5.2.3.3. Elektronmikroszkópia

8 órás iszkémia és 2 órás reperfúziót követően a lipid-szerű cseppek kifejezetten nagy számban voltak jelen a felvételeken. A metszeteken a mitokondriumok dezintegrációja is gyakran felfedezhető volt. A szarkoplazmatikus retikulum súlyos tágulatot mutatott (39/A-B ábra). Az elváltozások a mitokondrium gazdag rostokban nagyobb mértékűek voltak (39/B. ábra). A 9 órás kirekesztést követő reperfúzió a rostok többségében nekrotikus elváltozásokat idézett elő (39/C-D. ábra). A nem nekrotikus



39. ábra: A mitokondriumban szegény (A, C), illetve a mitokondriumban gazdag (B, D) izomrostok elektronmikroszkópos képe iszkémiás-reperfúziós károsodást követően

A, B: 8 órás iszkémiát és 2 órás reperfúziót követően a lipid-szerű cseppek kifejezetten nagy száma, illetve myelin figurák jelenléte volt jellemző, a dezintegrálódott mitokondriumok mellett. A szarkoplazmatikus retikulum súlyos tágulatot mutatott. Az elváltozások a mitokondrium gazdag rostokban (B) nagyobb mértékűek voltak;

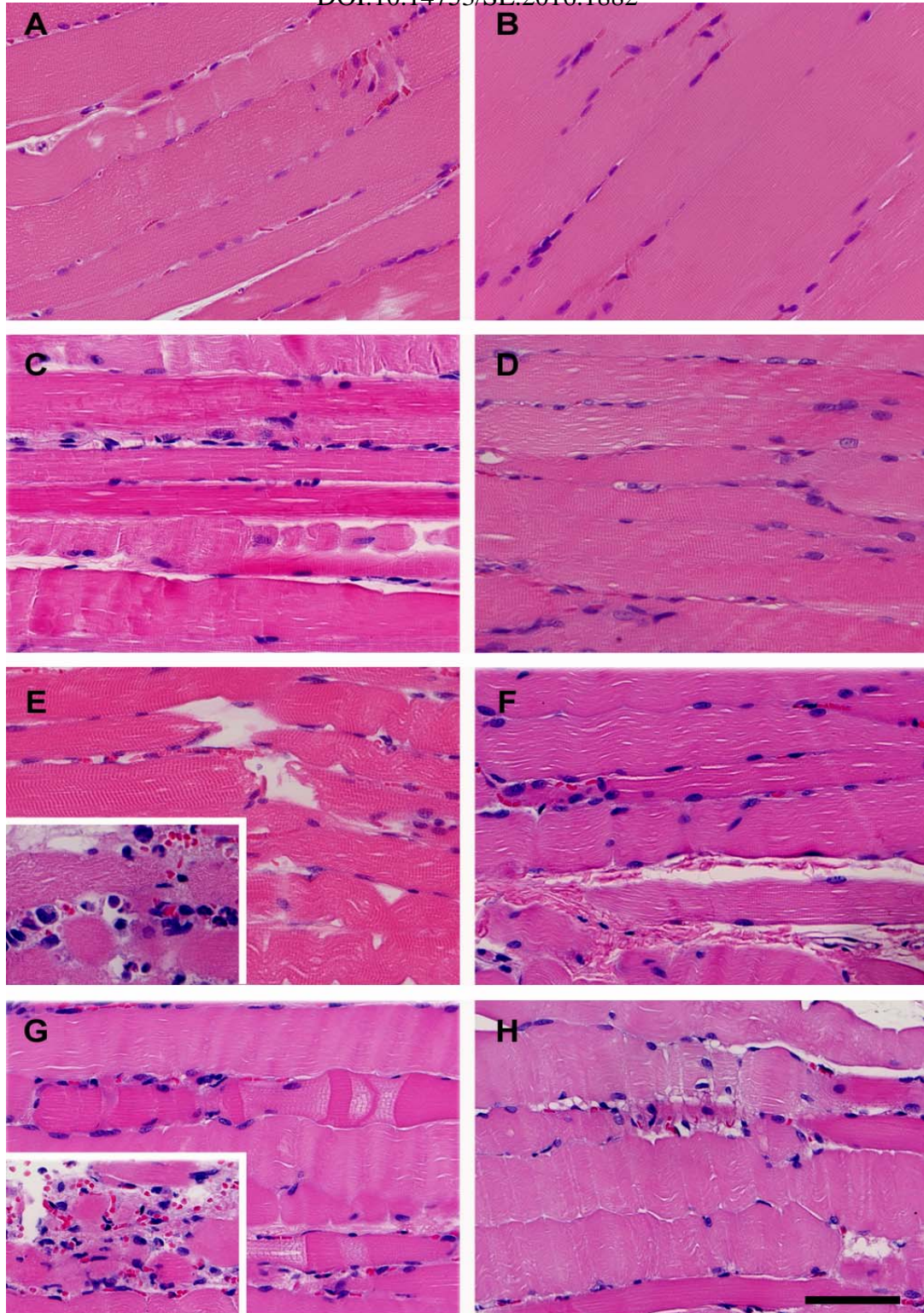
C, D: A 9 órás kirekesztést követő reperfúzió a rostok többségében nekrotikus elváltozásokat idézett elő. A nem nekrotikus rostokban a károsodás jelentősebb volt még az előző csoportban a mitokondriumban gazdag rostokban (B) tapasztaltaknál is. A két rosttípus között a károsodás mértékében különbséget ebben az időpont kimutatni nem lehetett. Bar: 2 μ m.

rostokban a károsodás jelentősebb volt még a 8IR csoportban a mitokondriumban gazdag rostokban tapasztaltaknál is.

5.3. III. Kísérlet: A posztkondicionálás vizsgálata

5.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálat

A hematoxillin-eozin festett metszeteken az áloperált csoportokban izomkárosodás jelei nem voltak láthatóak. A két óra hosszúságú reperfúzió a sérült izomrostok számának szignifikáns mértékű megemelkedésével járt mind a 2IR (40/A. ábra), mind a 2PC (40/B. ábra) csoportokban az áloperált állatokhoz képest ($p < 0,05$). 6 óra elteltével a károsodott izomrostok mennyisége tovább nőtt mindkét iszkémia-reperfúziót elszenvedett csoportban (40/C-D. ábra; $p < 0,001$), a posztkondicionált csoportban (39/C. ábra) azonban szignifikánsan kisebb mértékű izomkárosodás volt detektálható az IR csoporthoz képest (39/D. ábra). 12 óra elteltével a károsodás tovább növekedett mindkét csoportban ($p_{IR} < 0,05$; $p_{PC} < 0,001$). A 12IR csoport metszetein megjelentek az extracelluláris ödéma morfológiai jelei (40/E. ábra), továbbá gyulladásos sejtes beszűrődés volt látható (40/E. ábra, beszúrt kép). A posztkondicionálás ezen időpontban is képes volt a károsodás mértékének mérséklésére, mind az izomrostok számának ($p < 0,05$), mind az ödéma mértékének tekintetében (40/F. ábra). A posztkondicionált metszeteken gyulladás nem volt látható. 24 óra elteltével a károsodott izomrostok száma az előző időpillanathoz viszonyítva szignifikáns mértékben nem, valamint az ödéma és a gyulladás mértéke sem mutatott eltérést a korábbiakhoz képest a 24 IR csoportban (40/G. ábra). A posztkondicionálás ezen időpillanatban is képes volt a károsodást mérsékelni (40/H. ábra). Gyulladás a posztkondicionált metszeteken továbbra sem volt látható.

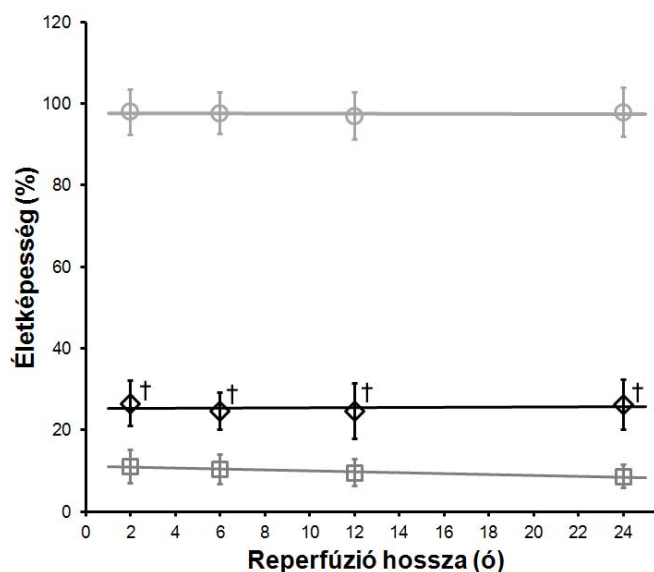


40. ábra: **Reprezentatív szövettani metszetek a poszt kondicionálás hatékonyságának vizsgálata során.**

Az iszkémiás-reperfúziós (IR) csoportokban a 8 órás iszkémia kismértékű károsodást okozott 2 óra reperfúziót követően (A). 6 órás hosszúságú reperfúzió után az izomkárosodás kifejezetté vált (C). 12 óra elteltével a károsodás mértéke tovább fokozódott, valamint extracelluláris ödéma jelei jelentek meg (E). Insert: Leukociták is megjelentek a szövettani metszeteken ezen időpontban. 24 órás reperfúziót követően sem az izomkárosodás, sem a szöveti ödéma mértéke nem nőtt tovább. (G). Insert: Leukocyták jelenléte ebben az időpontban is detektálható volt, változatlan mértékben. Habár a poszt kondicionálás 2 órás reperfúziót követően nem volt képes mérsékelni a szövettani károsodás mértékét (B), az ezt követő időpillanatok mindegyikében (6 órás csoport: D; 12 órás csoport: F; 24 órás csoport: H) a poszt kondicionálás alkalmazása képes volt az izomkárosodás mértékét csökkenteni az azonos időpillanatban vizsgált IR csoport metszeteihez képest. A poszt kondicionálás ezen felül képes volt limitálni a szöveti ödéma, valamint a gyulladásos sejt infiltráció kiterjedését 12 (F), illetve 24 (H) órás reperfúziót követően, az IR csoportokhoz képest. Festés: hematoxillin-eosin. Bar: 50 μ m.

5.3.2. Izomrost életképesség

Az izomrostok életképessége az áloperált csoportokban szignifikánsan nem változott a kísérlet alatt. A 8 órás iszkémiát követő 2 órás reperfúzió az izomrostok életképességének jelentős csökkenéséhez vezetett mindkét iszkémia-reperfúziót elszenvedett csoportban ($p < 0,001$) az áloperált csoporthoz képest. Az életképesség ezt követően szignifikáns változást nem



41. ábra: Az izomrostok életképességének változása a poszt kondicionálás hatására

(○) Áloperált; (□) Iszkémia-reperfúzió; (◇) Poszt kondicionálás;
† $p < 0,001$ az IR csoporthoz képest

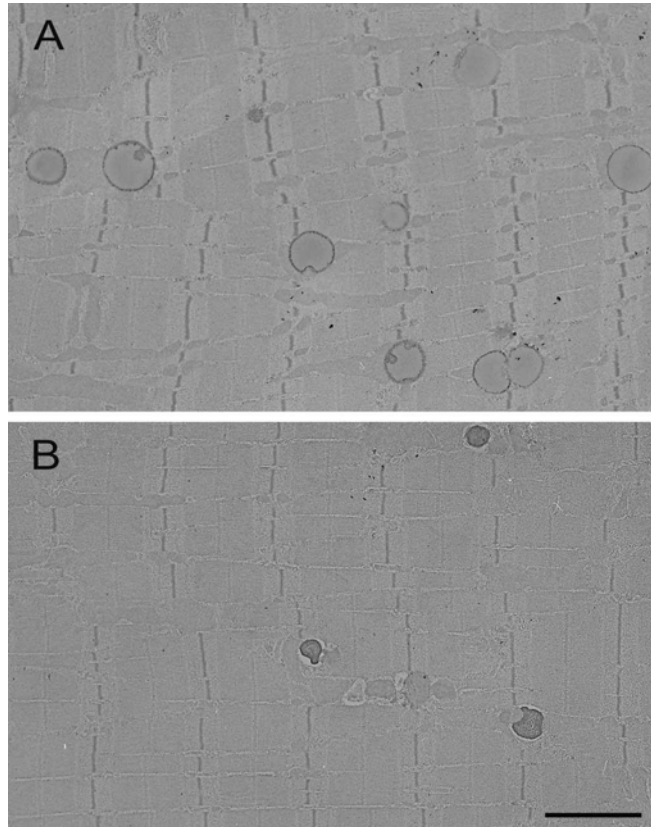
mutatott a kísérlet alatt egyik csoportban sem. Poszt kondicionálás hatására azonban az izomrostok életképessége szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott mindegyik vizsgált időpontban a megfelelő IR csoporthoz képest (41. ábra; $p < 0,001$).

5.3.3. Elektronmikroszkópia

2 órás reperfúziót követően a mitokondriumok jelentős mértékű duzzadása volt megfigyelhető. Az esetek egy részében szétesett mitokondriumok voltak láthatóak. A mitokondriumok helyén gyakran lipid-szerű homogén cseppek jelentek meg. A magok fokozott széli heterokromatinizációt mutattak (42/A. ábra). A poszt kondicionálás a mitokondriumok kisebb mértékű károsodását idézte elő (enyhe fokú duzzadás, szétesett mitokondriumok nem voltak láthatóak) a 2IR csoporthoz képest (42/B. ábra). A lipid-szerű cseppek száma is jóval csekélyebb volt a poszt kondicionált metszeteken.

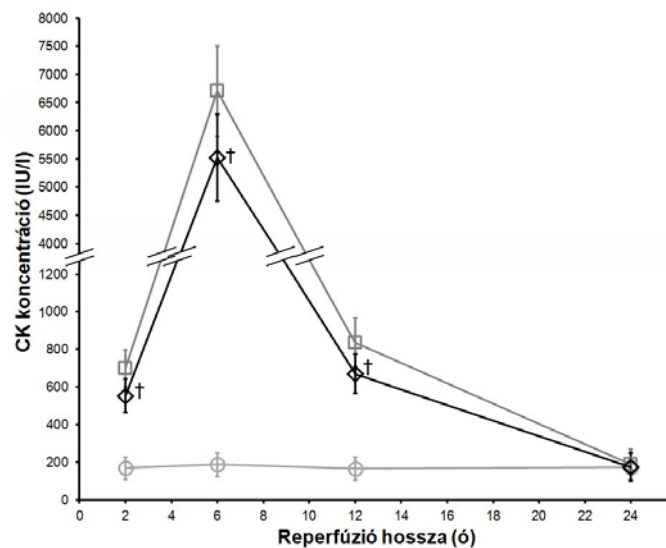
5.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok

Az áloperált csoportok szérumban a kreatin-kináz koncentrációi nem mutattak eltérést a kísérlet alatt. 2 óra reperfüziót követően a szérumban a CK szintek szignifikánsan megemelkedtek mindkét csoportban az áloperált csoporthoz képest ($p < 0,001$). A CK koncentráció 6 óránál csúcsot ért el, majd fokozatosan visszacsökkent az áloperált szintjére a posztoperatív 24 órá végére. A posztkondicionálás képes volt a szérumban a CK szintjeinek szignifikáns mértékű csökkentésére 2, 6 és 12 óra reperfüzió követően a megfelelő IR csoporthoz képest ($p < 0,05$). A 24. posztoperatív órában a CK szintek szignifikánsan nem különböztek egymástól egyik csoportban sem ($p > 0,05$; 43. ábra).



43. ábra: A posztkondicionálás hatása az ultrastrukturális károsodásra

A: az iszkémiás reperfüziós csoportban jelentős mértékű ultrastrukturális károsodás figyelhető meg; B: a posztkondicionált csoportban a károsodás jelentősen enyhébb. Bar: 20 μm .

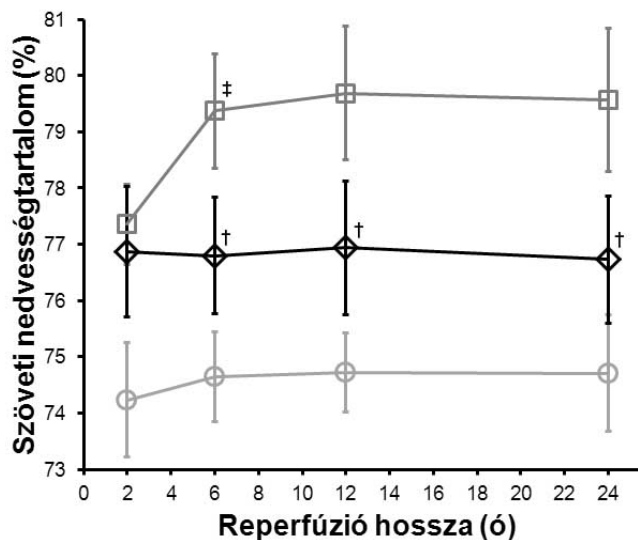


42. ábra: Szérumban a kreatin-kináz szintek

(o) Áloperált; (□) Iszkémia-reperfüzió; (◇) Posztkondicionálás; † $p < 0,05$ az IR csoporthoz képest

5.3.5. Az izomszövet nedvességtartalma

A 8 órás iszkémiát követő reperfúzió a végtagi ödéma mértékének szignifikáns emelkedéséhez vezetett mind a 2IR mind a 2PC csoportokban ($p<0,001$), az áloperálthoz képest. 6 órás reperfúzió a nedvességtartalom további emelkedéséhez vezetett a 6IR



csoportban ($p=0,01$), ezt követően az ödéma mértéke nem változott az idő

44. ábra: A szöveti nedvességtartalom

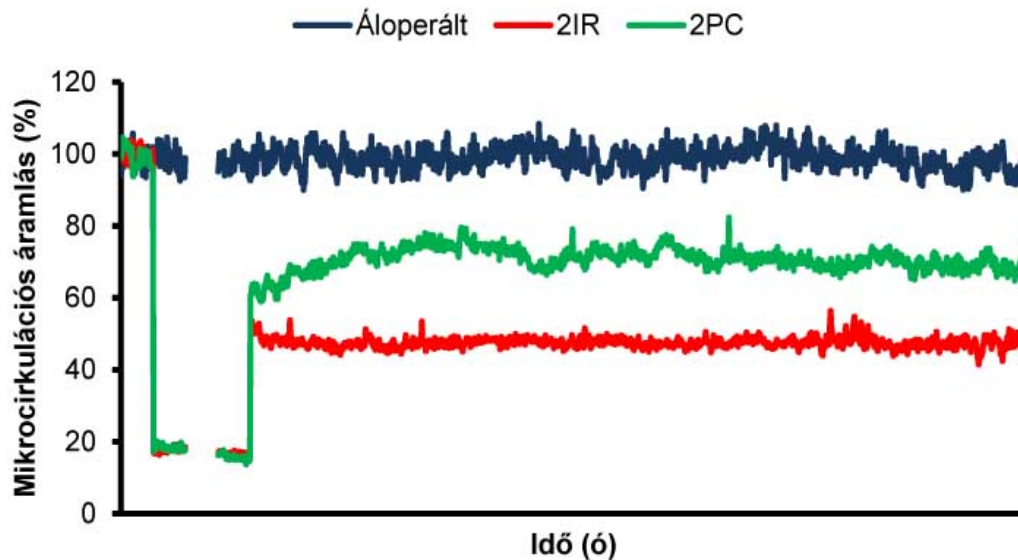
(○) Áloperált; (□) Iszkémia-reperfúzió; (◇) Poszt kondicionálás;
[†] $p<0,05$ az IR csoporthoz képest; [‡] $p<0,05$ az előző időponthoz képest.

előrehaladtával. A poszt kondicionálás a posztoperatív 2. órában nem volt képes az ödéma mértékének csökkentésére ($p>0,05$), azonban 6 óra elteltével minden mért időpontban szignifikánsan mérsékelte az izom nedvességtartalmát ($p<0,001$) a megfelelő IR csoporthoz képest. A poszt kondicionált csoportban az ödéma mértéke nem változott a kísérlet ideje alatt (44. ábra).

5.3.6. Végtagi mikrocirkuláció

A végtagi mikrocirkuláció mérésére a reperfúzió 2 órájának végéig került csupán sor, hiszen későbbi időpontokban az állatok felébresztését követően ezen paraméter további mérését technikai és standardizációs nehézségek megakadályozták. Míg az áloperált csoportban a kísérlet teljes ideje alatt az áramlás szignifikáns variációt nem mutatott, az aorta kirekesztése mind a 2IR, mind a 2PC csoportban az áramlás szignifikáns csökkenését okozta. Az iszkémia alatt az alapáramlás mindkét csoportban a kísérlet teljes ideje alatt 20% körül stabilizálódott. A reperfúzió kezdetén mindkét csoportban az áramlási értékek megemelkedtek. Míg a reperfúziós áramlás a 2IR csoportban közel 50%-os értéken stabilizálódott, addig a 2PC csoportban a végtag

mikrocirkulációja ennél szignifikánsan ($p<0,05$) magasabb 70% körüli áramlási értékeket ért el (45. ábra).



45. ábra: A mikrocirkulációs áramlás

5.4. Klinikai vizsgálatok eredményei

5.4.1. Demográfiai és anamnesztikus adatok

A populációs adatok részletesen a 6. és 7. táblázatban láthatók. A betegek átlagéletkora $60,8 \pm 9,5$ év volt, jelentős részük férfi (68,4%). A csoportok között a nemek eloszlása nem különbözött szignifikánsan. Az A csoportban a betegek szignifikáns mértékben fiatalabbak voltak a B csoporthoz képest ($p<0,001$). Az életkor tekintetében szignifikáns különbség nem volt kimutatható az A és C, valamint a B és C csoportok között, valamint az összetartozó (A1-A2 és B1-B2) alcsoportok között sem. A vizsgálatba bevont betegek mindegyike dohányzó volt. A betegek fele szenvedett magasvérnyomás betegségben (19 beteg). 26,3%-uknál fordult elő cukorbetegség (II-es típusú diabetes mellitus minden esetben), az A csoportban azonban cukorbetegség nem fordult elő. Korábbi pitvarfibrilláció 4 beteg esetében (10,5%) volt ismert, ezen betegek az A és C csoportokból kerültek ki, a B csoportban ritmuszavar nem fordult elő. A

betegek 10,5% szenvedett cerebrovaszkuláris megbetegedésben, míg 15,8%-uknál fordult elő korábban valamilyen tromboembóliás szövődmény. Ezen utóbbi két betegség a csoportok között eloszlási különbséget nem mutatott.

6. táblázat: **Demográfiai és kórelőzményi adatok a főcsoportokban**

	A csoport (n=15)	B csoport (n=18)	C csoport (n=5)
Átlagéletkor (é)	53,6±3,6	66,2±8,7‡	62,4±10,1
Férfi	10 (66,7%)	12 (66,7%)	4 (80,0%)
Dohányzás	15 (100%)	18 (100%)	5 (100%)
Diabetes	0 (0%)	8 (44,4%)†	2 (40,0%)
Szívbetegség	6 (40,0%)	3 (16,7%)	2 (40,0%)
Cerebrovaszkuláris betegség	1 (6,7%)	2 (15,3)	1 (20,0%)
Tromboembólia	2 (13,3%)	3 (16,7%)	1 (20,0%)
Pitvarfibrilláció	3 (20,0%)	0 (0%)	1 (20,0%)
Magasvérnyomás betegség	7 (46,7%)	9 (50%)	3 (60,0%)
Halálozás	3 (20,0%)	4 (22,2%)	1 (20,0%)
Végtagvesztés	4 (26,7%) [#]	5 (27,8%) [#]	5 (100%)
Kórházban töltött nap	7,4±3,9	8,2±4,2	9,8±2,6

A csoport: megelőző érbetegség nélkül; B csoport: ismert krónikus verőérbetegség; C csoport: primer amputáció szükségessége

†p<0,01 az A csoporthoz képest; ‡p<0,001 az A csoporthoz képest; #p<0,01 a C csoporthoz képest.

7. táblázat: **Demográfiai és kórelőzményi adatok az alcsoportokban**

	Group A1 (n=11)	Group A2 (n=4)	Group B1 (n=13)	Group B2 (n=5)
Átlagéletkor (é)	52.8±3.5†	55.7±2.8	65.8±7.5 [#]	67.4±11.3
Férfi	7 (63.6%)	3 (75.0%)	8 (61.5%)	4 (80.0%)
Dohányzás	11 (100%)	4 (100%)	13 (100%)	5 (100%)
Diabetes	0 (0%)‡	0 (0%)†	3 (23.1%)†	5 (100%)
Szívbetegség	4 (36.4%)	2 (50.0%)	1 (7.7%)	2 (40.0%)
Cerebrovaszkuláris b.	1 (9.1%)	0 (0%)	1 (7.7)	1 (20.0%)
Tromboembólia	1 (9.1%)	1 (25.0%)	2 (15.4%)	1 (20.0%)
Pitvarfibrilláció	2 (18.2%)	1 (25.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Magasvérnyomás b.	4 (36.4)	3 (75.0%)	5 (38.5%)	4 (80%)
Halálozás	2 (18.2%)	1 (25.0%)	3 (23.1%)	1 (20.0%)
Kórházban töltött nap	5.8±2.4† ^{\$}	11.7±4.5	6.4±2.6† ^{\$}	12.8±4.1

A1 és B1 csoport: sikeres revaszkularizáció; A2 és B2 csoport: szekunder amputáció szükségessége

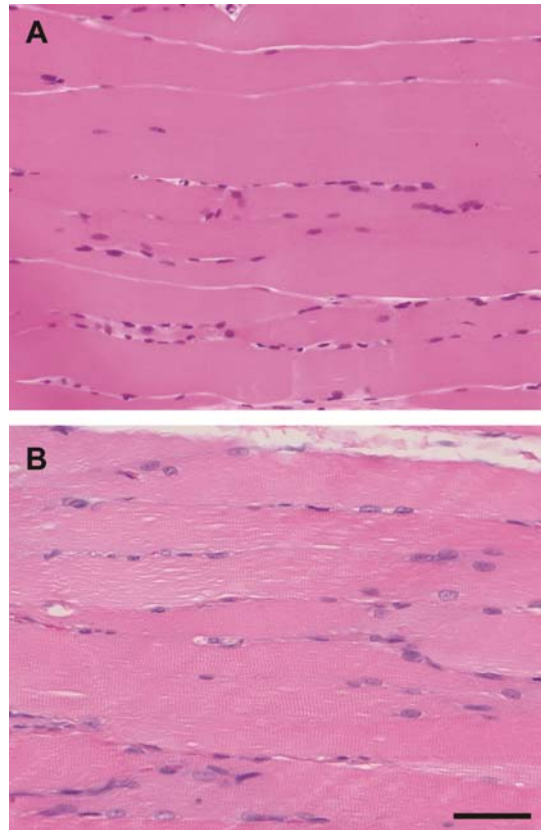
[#]p<0,01 az A1 csoporthoz képest; ^{\$}p<0,05 az A2 csoporthoz képest;

†p<0,01 a B2 csoporthoz képest, ‡p<0,001 a B2 csoporthoz képest.

5.4.2. Fénymikroszkópia

Az A1 csoportban a m. pectineusból gyűjtött kontroll minták a károsodás jeleit nem mutatták (46/A. ábra). Ezen csoport intraoperatív iszkémiás metszetein kismértékű vakuolizáció és enyhe intracelluláris ödéma volt megfigyelhető, mely kismértékű izomkárosodásra utal (46/B. ábra). Az A2 csoport kontroll metszetein sem volt látható káros eltérés (47/A. ábra). Az iszkémiás, revaszkularizációt megelőzően gyűjtött metszeteken közepes mértékű

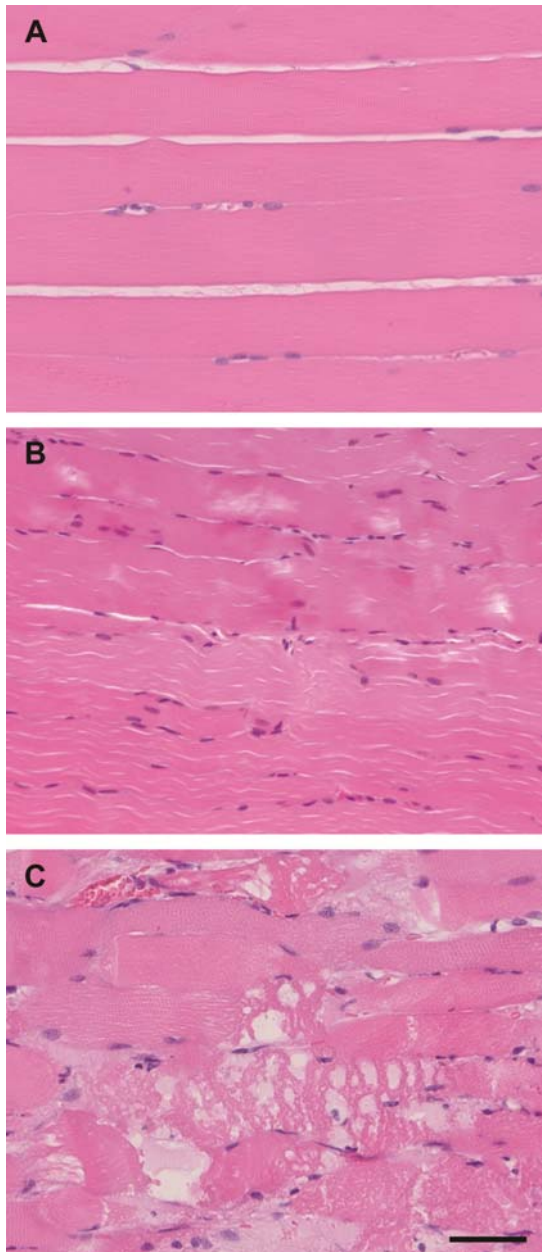
izomkárosodás jelei látszódtak (47/B. ábra), nekrosis nem ábrázolódott. Az amputációt követően azonban már jelentős mértékű nekrosis figyelhető meg ebben a csoportban (47/C. ábra).



46. ábra: **Reprezentatív szövettani metszetek az A1 csoportban**

A: a kontroll metszeteken nem látható károsodás;
B: az iszkémiás metszeteken enyhe fokú sérülés figyelhető meg.

Festés: hematoxillin-eosin, bar: 50 µm.



47. ábra: **Reprezentatív szövettani metszetek az A2 csoportban**

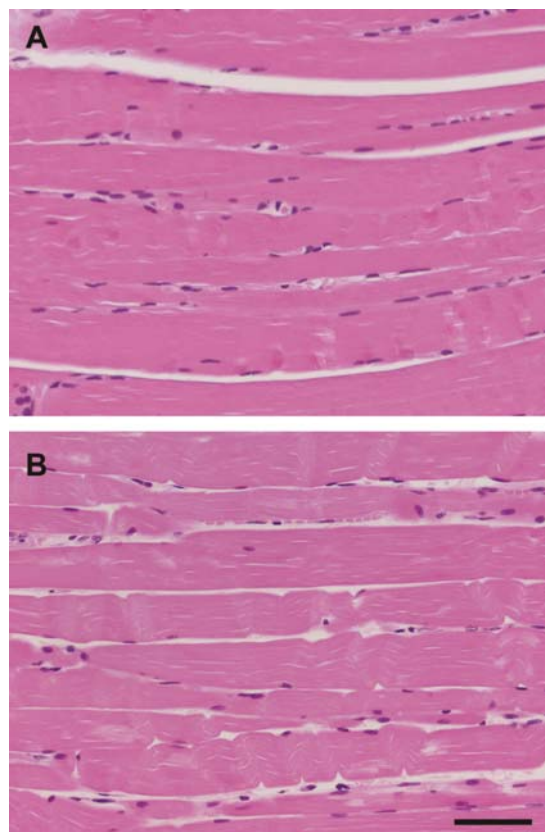
A: a kontroll metszeteken károsodás nem látható; B: a revaszkularizációt követően közepes mértékű iszkémiás károsodás látható a rostok festődésének megváltozásával, hullámos izomrostok megjelenésével;

C: az amputált végtagokban nagyfokú nekrozis volt megfigyelhető.

Festés: hematoxillin-eosin, bar: 50 µm.

mértékű károsodást mutattak (49/B. ábra), míg az amputált végtagokban jelentős mértékű nekrozis volt látható, mely kiterjedésében hasonló volt az A2

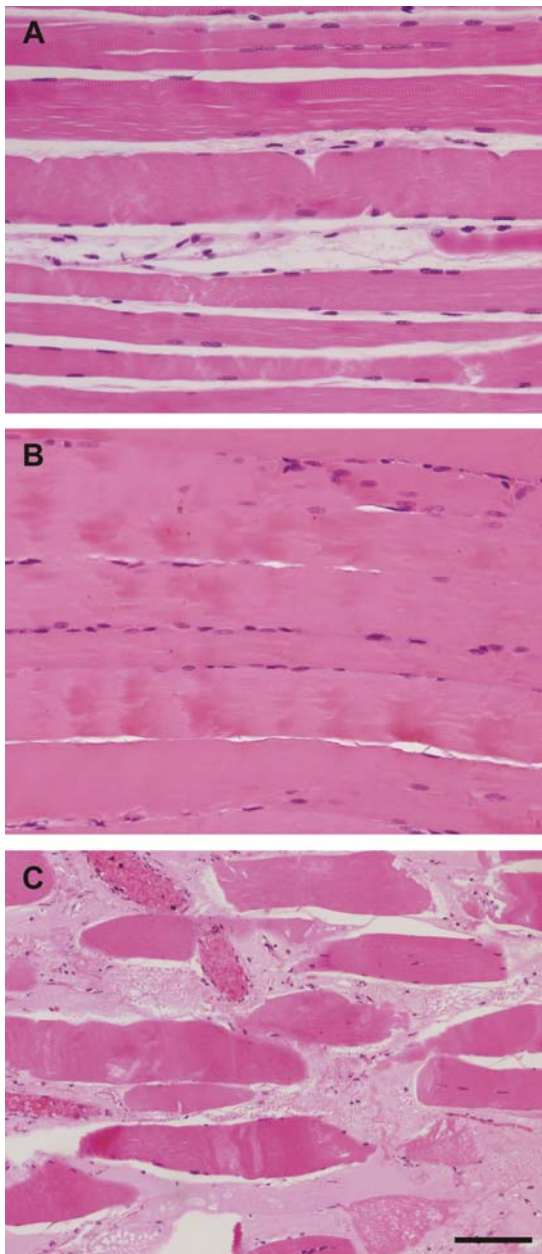
A B1 (48. ábra) és B2 (49. ábra) csoport kontroll mintáin (A) a krónikus iszkémia jelei voltak megfigyelhetőek, ún. intersticiális fibrózis, atrófiás izomrostok. A kontroll mintákban nekrozis nem volt jelen. A B1 csoport iszkémiás mintáin a kontroll csoportokban megfigyelhető változásokon felül csak enyhe mértékű károsodás volt tapasztalható, mely összevethető mértékű az A1 csoportnál tapasztaltakkal (48/B. ábra). A B2 csoport revaszkularizációt megelőző tibialis anterior izom metszetei közepes



48. ábra: **Reprezentatív szövettani képek a B1 csoportban**

A: a kontroll metszeteken a krónikus iszkémiának megfelelően enyhén atrófiás izomrostok láthatóak; B: az iszkémiás metszeteken enyhe fokú károsodás látható.

Festés: hematoxillin-eosin, bar: 50 µm.



49. ábra: **Reprezentatív szövettani képek a B2 csoportban**

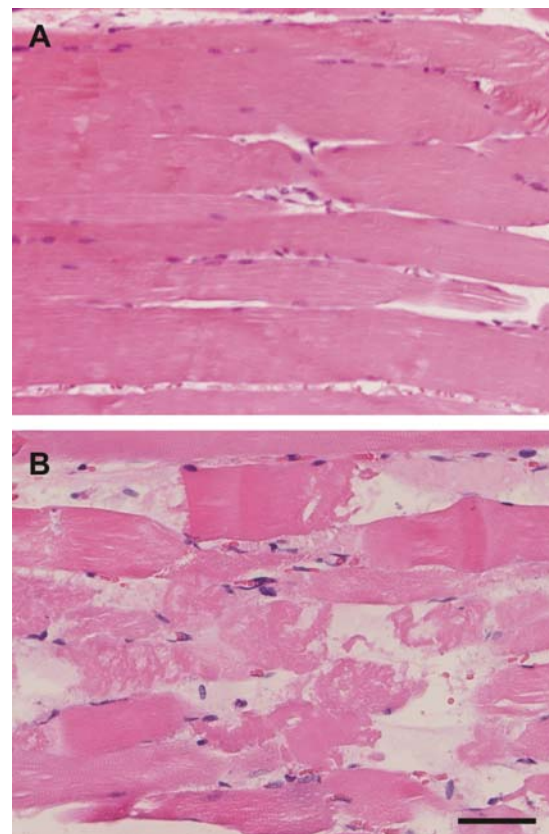
A: a kontroll metszeteken a krónikus iszkémiának megfelelően enyhén atrófiás izomrostok láthatóak; B: a revaszkularizációt követően közepes mértékű iszkémiás károsodás látható a rostok festődésének megváltozásával, hullámos izomrostok megjelenésével;

C: az amputált végtagokban nagyfokú nekrosis figyelhető meg.

Festés: hematoxillin-eosin, bar: 50 µm.

csoportban látottakhoz (49/C. ábra).

A C csoport kontroll mintáin a krónikus iszkémiás károsodás jelei voltak megfigyelhetők nekrosis nélkül, hasonlóan a B csoport kontroll mintáihoz (50/A. ábra). A m. tibialis anteriorból származó szövettani mintákon a károsodás az A2 és B2 csoportok amputáción átesett metszetein tapasztaltakkal összevethető mértékű volt (50/B. ábra).



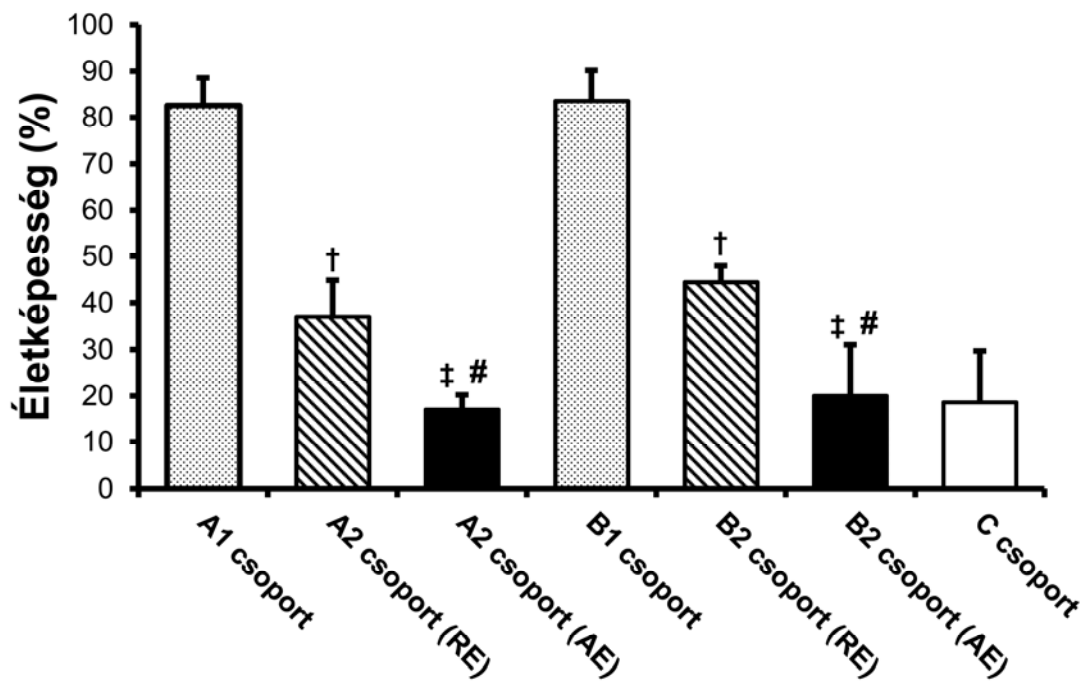
50. ábra: **Reprezentatív szövettani képek a C csoportban**

A: a kontroll metszeteken a krónikus iszkémiának megfelelően enyhén atrófiás izomrostok láthatóak; B: az amputált végtagokban nagyfokú nekrosis figyelhető meg.

Festés: hematoxillin-eosin, bar: 50 µm.

5.4.3. Életképesség vizsgálatok

Az A1 és B1 csoportokban, melyekben a revaszkularizáció sikeresnek bizonyult magas életképesség értékeket regisztráltunk. A két csoport között szignifikáns különbség nem volt tapasztalható ($p>0,05$). Az A2 és B2 csoport revaszkularizációt megelőzően gyűjtött mintáin az életképesség jelentős, szignifikáns mértékű csökkenését figyelhettük meg ($p<0,05$). Mindkét csoportban az életképesség valamennyi beteg esetében az 50%-os érték alá esett a csoportok között szignifikáns különbség nélkül. Ezen csoportok amputációt megelőzően gyűjtött mintáiban az életképesség tovább csökkent mind az A1 és B1 csoportokhoz képest ($p<0,01$), mind a A2 és B2 csoport revaszkularizációt megelőző mintáihoz képest ($p<0,05$). A két amputált csoport között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető. A C csoportban az életképesség az A2 és B2 csoport amputált végtagjaiban tapasztalt károsodással azonos mértékűnek mutatkozott, az értékek nem tértek el szignifikánsan a 3 csoportban ($p>0,05$; 51. ábra).



51. ábra: Az izomrostok életképességének változása a humán vizsgálatok során

szürke hasáb: sikeres revaszkularizáció; csíkolt hasáb: szekunder amputáció szükségessége esetén revaszkularizációt megelőzően; fekete hasáb: szekunder amputáció; fehér hasáb: primer amputáció; † $p<0,05$ a kiegészítő alcsoportokhoz képest; ‡ $p<0,05$ a kiegészítő alcsoportokhoz képest; # $p<0,05$ a revaszkularizáció előtti értékekhez képest; RE: reperfúzió előtt; AE: amputáció előtt.

5.4.4. Utánkövetés

A vizsgált betegcsoportban a 30 napos mortalitás 21,1% volt, a mortalitási adatok a csoportok között nem különböztek szignifikánsan, míg a végtagvesztés gyakorisága ugyanezen időtartam alatt 36,8%-nak adódott. Mind az A, mind a B csoportban az esetek kb. $\frac{1}{4}$ -ében kényszerültünk amputációra. Az átlagos kórházban töltött napok száma vizsgálatunkban $11,3 \pm 4,8$ nap volt. Eredményeink szerint azokban a csoportokban, ahol szekunder amputációra kényszerültünk (A2 és B2 csoportok) a kórházban töltött napok száma szignifikánsan hosszabb volt ($p < 0,05$), mint azon beteg esetében, kiknél a revaszkularizációs eljárás sikeresnek bizonyult (A1 és B1 csoportok). A szekunder amputációs csoportokban (A2 és B2 csoportok) átlag $2,7 \pm 1,4$ nap telt el a revaszkularizáció és az amputáció között, a két alcsoport között szignifikáns különbség nem volt észlelhető (6. táblázat).

6. MEGBESZÉLÉS

A végtagi akut artériás okklúzív betegségek a klinikai gyakorlatban nagy jelentőséggel bírnak, mivel gyakori előfordulásuk mellett komoly szövődményekkel járhatnak, illetve a megfelelő időben való felismerés és beavatkozás elmaradásának következményei akár fatálisak is lehetnek. Ezen szövődmények a súlyos lokális izomnekrózis következtében kialakuló végtagvesztésen túl akár többszervi elégtelenségig is progrediálhatnak, melyek szív-, tüdő- és veseelégtelenségként, vagy éppen a koagulációs- és gasztrointesztinális rendszerek súlyos fokú károsodásaként manifesztálódhatnak. Ezen szövődmények kialakulási valószínűségének csökkentésére tehát nagy a klinikai igény. Két fő irányvonal kínálkozik ezen cél megvalósítására. Az első irányvonalként a károsodás mértékének pontos, megfelelő időben történő megítélése kínálkozik, míg másodikként a már kialakult károsodás mértékének csökkentése kerül előtérbe.

A károsodás mértékének pontos megítélése a megfelelő terápiás döntést facilitálhatja. Míg enyhe károsodás esetén a revaszkularizáció biztonsággal elvégezhető, súlyosabb károsodások esetén azonban a primer amputáció a megfelelő eljárás a súlyos, szisztémás szövődmények kivédésére. Jelenleg azonban a károsodás mértékének pontos megítélése nem lehetséges. Az egyetlen rendelkezésre álló score rendszer, mely Rutherford és munkatársai nevéhez fűződik, is főként a revaszkularizációs beavatkozás sürgősségének, mint a károsodás mértékének megítélésére alkalmas.⁵⁸ Tekintettel arra, hogy az akut végtagi elzáródások esetén a végtagi iszkémia ideje gyakran igen hosszú; a vértelenség intervalluma könnyen túlhaladhat a végtag iszkémia toleranciáján, irreverzibilis izomkárosodást okozva. Az irreverzibilis károsodások esetén a definitív terápiát az amputáció jelenti.⁵² A károsodás mértékének pontos ismerete hiányában azonban előfordulhat, hogy az irreverzibilisen károsodott végtag revaszkularizációs kísérletre, műtetre kerül (hiszen a klinikai jelek nem kellően specifikusak), ami csak a korábban már részletezett súlyos, szövődmények kialakulási valószínűségét növeli meg jelentősen, terápiás értéke nincs. Az ilyen esetben kialakuló többszervi elégtelenség folyamatos intenzív terápiás ellátást igényelő kórállapot, mortalitása még intenzív kezelés mellett is nagyon magas. Az általunk bemutatott esettanulmány egy ilyen helyzetet demonstrál, mely esetében a klinikai jelek egy viszonylag enyhe károsodást

jeleztek, azonban a valóságban egy súlyos izomkárosodás volt jelen, melynek revaszkularizációját követően súlyos lokális és szisztémás károsodások alakultak ki, rapid fatális kimenetellel. Ezen esettanulmány hívta fel a figyelmünket a károsodás mértékének megfelelő időben történő meghatározásának fontosságára, kísérletsorozatunk ezen tanulmány képezi elméleti alapját.

Kevés olyan módszer áll rendelkezésre, mely objektíven képes lenne a sérülés mértékét már az iszkémia alatt pontosan meghatározni, melyeket a bevezetésben részletesen ismertettünk. Továbbá sajnálatos módon ezen technikák a hosszú előkészítési idő következtében nem alkalmazhatóak a klinikai gyakorlatban.

Kísérleteink első ütemének célja volt egy olyan módszer kidolgozása és vizsgálata állatkísérletek segítségével, mely a károsodás mértékét klinikailag releváns időablakon belül lehet képes pontosan meghatározni.

Annak okán, hogy a kapott eredmények klinikai körülményekhez való megfeleltethetőségét maximalizáljuk, először is egy megfelelő állatmodellt kellett kiválasztanunk. A bevezetésben már ismertetésre kerültek az irodalomban fellelhető állatmodellek. Ezen modell rendszerek közül a komplett iszkémiás modellek nem alkalmazhatóak a mi vizsgálataink során, hiszen egy akut klinikai szituációban a kollaterális érhálózat jelenlétével számolnunk kell,¹² bizonyos mértékű reziduális perfúzió mindig jelen van.⁹⁶ A reziduális perfúzióval rendelkező modellek közül az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése tűnik a legjobb választásnak, hiszen ezen kirekesztés alkalmazása képes megfelelő mértékű iszkémiát létrehozni, megtartott reziduális perfúzió mellett.⁹⁸ A modell további előnye, hogy egyszerűen kivitelezhető módon, közvetlenül modellez klinikai szituációkat.

Az aorta okklúziós modell kétséget kizáró alkalmazhatóságának vizsgálatára előkísérleteket végeztünk, melyek során az aorta okklúzió által okozott izomkárosodást egy komplett iszkémiás modell (külső leszorítás alkalmazása) által kiváltott sérüléssel hasonlítottuk össze standard iszkémiás-reperfúziós idők felhasználásával, valamint megvizsgáltuk, hogy a nagyér-kirekesztés során valószínűsíthető reziduális perfúzió milyen forrásból származhat.

Az iszkémiás izomkárosodás mértékét jól jelzik a szérum nekroenzim szintjei.⁷⁷ Vizsgálataink során jelentősen emelkedett szérum kreatin-kináz és laktát-dehidrogenáz szinteket találtunk mindkét okklúziós csoportban, mely megegyezik korábbi vizsgálatok

által leírtakkal.^{77, 142, 143} Az adatok alapján megfigyelhető volt, hogy a szérumban LDH szintjei az egyes csoportokban kisebb mértékben emelkedtek meg a CK koncentrációkhoz képest, mely szintén régóta ismert.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Eredményeink alapján látható, hogy a tourniquet alkalmazása által indukált iszkémia kifejezetten nagyobb károsodást okozott az aorta okklúzióhoz képest, azonban az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése önmagában is jelentősen emelkedett nekroenzim szinteket idézett elő.

A szérumban K^+ szintjeinek megemelkedése alsó végtagi iszkeémiát követően ismert, mely a raktomiolitikus izomrostokból kiszabaduló nagy mennyiségű K^+ ion direkt következménye.^{145, 146} Jelen kísérletünk során is a szérumban K^+ koncentrációinak jelentős megemelkedését tapasztaltuk. Ugyan a tourniquet kirekesztés a vártan megfelelően jelentősebb koncentráció-emelkedést okozott, az aortakirekesztés kapcsán is nagy mértékű K^+ szint emelkedést tapasztaltunk, mely jelentős izomkárosodást feltételez.

Az izom sérülésének jelenlétét mindkét csoportban a szövettani változások is igazolták. Míg a tourniquet által kiváltott iszkémia, a korábban megfigyeltékhez hasonlóan az izomrostok nekrozisához vezetett,^{107, 147} az aorta okklúzió csekélyebb, de nem elhanyagolható mértékű károsodást okozott az izomrostokban. Ezt a szérumban TNF- α szintjeiben tapasztalt változások is alátámasztják, melyek a fenti eredményekhez hasonlóan alakultak. A szérumban TNF- α koncentrációinak emelkedése a lokális károsodások következtében jön létre, így alkalmazható a károsodás mértékének becslésére.¹⁴⁸

A két csoport között tapasztalt különbség háttérben a reziduális flow jelenléte feltételezhető.^{149, 150} Kísérleteink során vizsgáltuk az izomszövet mikrocirkulációs áramlását és azt tapasztaltuk, hogy míg tourniquet alkalmazása esetében a mikrocirkulációs áramlás teljesen megszűnik (nem publikált adat), addig az aortakirekesztés során az alapáramlás 20%-ának megfelelő reziduális áramlás fennmarad. Ezen áramlás forrásának feltárására korróziós preparátumokat készítettünk, hogy láthatóvá tegyük az alsó végtagot infrarenális aorta okklúzió esetén ellátni képes kollaterális rendszereket.

Korábbi vizsgálatok az iliolumbális, epigasztriális, valamint disztális interosztális, szubosztális rendszerek alsó végtagot ellátó képességét írták le.^{151, 152} Az említett artériás rendszerek a comb, az a. iliaca interna, vagy externa artériás hálózatával

anasztomizálva képesek az alsó végtag kollaterális érellátását biztosítani.¹⁵¹ Ezen kollaterálisok jelenlétét jelen kísérletünk is igazolta. Az általunk alkalmazott korróziós technika azonban a korábban alkalmazott hasonló módszerekkel szemben sokkal érzékenyebb. Ezen fokozott érzékenység lehetővé tette további, eddig fel nem fedezett anasztomózis-hálózatok megfigyelését, mint a szakrális érhálózat gerincvelői véredényekkel való kapcsolata, valamint az általunk laterálisnak nevezett anterior kollaterális hálózat, melyek jelentősen hozzájárulhatnak az alsó végtag vérellátásához aorta okklúzió esetén, a korábban leírt kollaterális útvonalak mellett, valamint ezen új kollaterálisok felismerésével az egyes iszkémiás modellek között különbségek is jobban érthetővé válnak.

Mikrocirkulációs eredményeink szerint azonban a fent részletezett kollaterálisok aorta kirekesztés esetén csupán az alapáramlás 20%-ának megfelelő perfúziót képesek biztosítani a végtagban. Irodalmi adatok szerint az alapáramlás 30%-ánál kevesebb mértékű flow már megfelelő mértékű iszkémia létrehozására képes az izomszövetben.¹⁵³ Tehát a mikrocirkulációs eredmények, az előkísérletünk során vizsgált további paraméterekkel (szérum markerek, szövetten) összhangban igazolják, hogy az aorta okklúziója, ugyan nem képes egy komplett iszkémiás modellhez hasonló mértékű károsodást létrehozni, mégis, a kifejlődő iszkémiás-reperfúziós sérülés kiterjedése megfelelő ahhoz, hogy az a klinikai szituációk modellezésére szolgáljon.

A modell alkalmazásakor azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni alkalmazásának hátrányait, melyek a bevezetésben már említésre kerültek. Ezen hátrányok kiküszöbölésére nagy figyelmet fordítottunk, hogy a modell klinikai relevanciáját maximalizáljuk: (1) A reziduális perfúzió mértékének ellenőrzésére az iszkémia alatti mikrocirkulációt folyamatosan monitoroztuk. Ismert, hogy a végtagok akaratlagos mozgása a reziduális perfúzió mértékét befolyásolhatja, ami a fokozott energiaigény következtében létrejövő vazodilatációval függhet össze.¹⁵⁴ A kísérlet során a megfelelően mély anesztézia biztosítására törekedtünk, az állatok mozgásának kiküszöbölése érdekében. Az iszkémia, valamint az ezt követő 2 óra reperfúzió alatt tehát az állatok folyamatos, mély altatásban voltak, melynek következményeként a reziduális flow a vizsgálat ideje alatt szignifikáns eltérést nem mutatott egyik állatban sem. (2) A belső kontroll alkalmazásának hiányát kezeletlen kontroll állatok vizsgálatával váltottuk fel, mely egyes kutatások szerint jóval alkalmasabb valódi

kontrollként való használatra,¹⁰⁵ hiszen a belső kontroll a szisztémás változások következtében szignifikáns elváltozásokon mehet keresztül egy kísérlet során.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ (3) A nemek közötti különbségeket egynemű állatok bevonásával minimalizáltuk.

A megfelelő modell kiválasztása, illetve klinikai modellként való alkalmazhatóságának maximalizálását követően az iszkémiás károsodás mértékének klinikai időablakon belüli meghatározására képes módszer kifejlesztésére került hangsúly.

A bevezetésben leírtak alapján feltételezhetően a legalkalmasabb eljárás erre a célra az úgynevezett tetrazólium sók alkalmazása, mely segítségével a mitokondriumok épségéről kaphatunk információt.¹⁵⁵ A mitokondriumok sérülése nagy jelentőséggel bír a sejtkárosodás szempontjából.⁶⁹ Ezen sejt organellek károsodása következtében a sejtek energia háztartása felborul, az energiaszint jelentősen lecsökken,¹³ mely közvetlen kiváltója lehet a sejthalálnak.⁶⁸ Így a mitokondriumok épsége a sejtek épségével áll szoros kapcsolatban, tehát ezen organellek épségének vizsgálata jelentheti a megoldást az általunk felvetett problémára.

Egy, a sérülés kiterjedését meghatározni képes technika klinikai alkalmazásakor fő szempont továbbá a számszerűsíthető eredmények megfelelő időablakon belüli biztosítása. Az irodalomban főként spektrofotometriai^{72, 111, 156-159} és planimetriai^{75, 130, 160-163} technikák (lásd bevezetés) állnak rendelkezésre a tetrazólium reakció kvantifikálására. Habár mindkét módszer megfelelően képes jelezni az izomkárosodás mértékét,⁷¹ mindeztidáig szinte kizárólag a keringés megindulását követően kerültek alkalmazásra, reperfüziót megelőző alkalmazásról csak planimetria esetében tudunk, ebben az esetben is csak elenyésző számú közlemény született a témában.^{4, 164} Azon túl, hogy ezen technikák kizárólag iszkémiás állapotok között történő vizsgálata még nem kielégítő, a mintafeldolgozásban rejlő hátrányok tovább akadályozzák ezen módszerek klinikai alkalmazását: a spektrofotometriás módszer esetében a minta-előkészítési idő jelentős, így elterjedése a diagnosztikus algoritmusban igen kétséges. Planimetria esetében azonban nem feltétlenül a feldolgozási idő, hanem a mintavételezés módja jelent akadályt. Planimetriás mintavételezés során a megfelelően pontos eredmény elérése érdekében nagy mennyiségű izomszövet szükségeltetik, amely klinikai szituációban nem megengedhető. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a nagy

mennyiségű szövet kiértékelése szintén több időt vehet igénybe, mint az klinikailag elfogadható lenne.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy iszkémia hatására nem csak az izom makroszkópos, hanem mikroszkópos festődésében is változások alakulnak ki tetrazolium reakcióval. Carmo-Araujo és munkatársai fagyaszott metszeteken alkalmazva a tetrazolium reakciót azt tapasztalták, hogy iszkémia hatására (reperfúzió nélkül is) a tetrazolium redukció mértéke csökken.¹⁶⁵ A fagyasztott metszetek alkalmazása a klinikai gyakorlatban széles körben elterjedt eljárás, mely lehetővé teszi a gyors, intraoperatív diagnózist.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Mindezek okán a tetrazolium reakciók fagyasztott metszeteken történő alkalmazása megteremtheti tehát egy gyors diagnosztikai eljárás alapjait az akut végtagi iszkémia ellátása kapcsán.

Az általunk kifejlesztett új eljárás egyesíteni próbálja az előbb részletezett módszerek előnyeit. A technika lényege, hogy a tetrazolium reakciót fagyasztott metszeteken alkalmazzuk, majd a keletkezett reakció mennyiségét egy számítógépes program segítségével meghatározzuk.

Az eljárás kifejlesztése során nagy hangsúlyt fektettünk a mintafeldolgozásból adódó különbségek kiküszöbölésére, ennek okán a különböző időpontban gyűjtött metszetek feldolgozása egyazon napon történt meg. A festődési különbségek kiküszöbölésére a metszetek megfestése frissen készített azonos oldatban, egyazon időben történt, így az oldat koncentrációjában, illetve a festési idő hosszában esetlegesen fellépő különbségek gyakorlatilag eliminálhatóak voltak. A kísérletek időigényessége miatt a mintagyűjtés azonos napon való kivitelezése lehetetlen lett volna. Így a mintatárolás időtartamában fellépő különbségek esetleges befolyásoló tényezőként hathatnak, habár korábbi közlemények szerint a mintatárolás oxidáz-enzim aktivitást módosító hatása elenyésző.¹⁶⁹

Ezen felül a szoftvert alkalmazása során is különös gondot fordítottunk a megfelelő színtartomány meghatározásának pontosságára, annak mitokondrium specifikusságára a Módszerek fejezetben részletezett módon. Az utóbbi a nitroblue-tetrazolium lipidoldékony tulajdonsága miatt igényelt különös odafigyelést. Mint már a Bevezetésben említettük, a tetrazolium sók képesek a mitokondriumokon kívül egyéb szubcelluláris (pl. szarkoplazmatikus retikulum) kötődni, ezzel aspecifikus festődést létrehozni, mely az életképesség pontos meghatározását zavarhatja.⁷⁰ Ennek okán a

megfelelő szintartomány meghatározása során az aspecifikus festődés minimalizálására, a specifikus festődés maximalizálására nagy gondot fordítottunk.

Az eljárás gyorsasága főként a festési eljárás sebességétől függ, hiszen a mintaelőkészítés, illetve a poszt-processzálás néhány perc alatt elvégezhető. Számszerűen a minta előkészítése, illetve a fagyasztva metszés 5-10 percet vesz igénybe. A jelenleg használt festési eljárás elvégzéséhez azonban már körülbelül 40 perc szükséges, míg a kvantitatív, szoftveres kiértékelés további 10-15 perc alatt elvégezhető. A jelenlegi eljárás alkalmazásával tehát körülbelül egy órán belül kvantitatív eredményekhez juthatunk. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a szoftver megfelelő használatához gyakorlás szükséges.

Növekvő iszkémiás idők alkalmazásával vizsgáltuk a technika hatékonyságát. Eredményink az izomrostok életképességének (a tetrazólium reakció mértékének) fokozatos csökkenését jelezték mind a rostok össz-életképessége szempontjából, mind az I-es, illetve IIb típusú rostok szelektív életképessége tekintetében. Eredményeink szerint továbbá az I-es típusú rostok szignifikánsan nagyon mértékű károsodást szenvedtek, mint a IIb típusúak. Erős, szignifikáns negatív korrelációt találtunk az iszkémia hossza, illetve a mért életképesség értékek mögött, mind az össz-életképesség, mind az egyes rostoknál mért szelektív életképesség tekintetében. Fokozatosan növekvő iszkémiás idők tekintetében hasonló, progresszív életképesség csökkenést figyeltek meg Blebea és munkatársai planimetriás eljárás alkalmazásával, azonban a szerzők hasonló korrelációt nem találtak módszerükkel.⁴ Homer-Vanniasinkam és munkatársai azonban 10 órás iszkémiát követően sem találtak semmilyen mértékű életképesség csökkenést planimetriával,¹⁶⁴ ami további kétségeket kelt a planimetria alkalmazásával kapcsolatban.

Annak érdekében, hogy ellenőrizzük a kapott életképesség értékek az izomkárosodás valódi mértékének felelnek-e meg, elektron mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Az ultrastrukturális eredmények az iszkémia idejének előrehaladtával növekvő mértékű károsodást igazoltak, mely alátámasztja az izomrost-életképesség vizsgálataink hatékonyságát. Továbbá az elektron mikroszkópban látható mitokondriumban gazdag rostok (melyek nagy valószínűséggel megfeleltethetők az I-es típusú rostoknak) nagyobb ultrastrukturális károsodást szenvedtek, mint a mitokondriumban szegény (nagy valószínűséggel a IIb típusú) rostok, mely eredmények

szintén egybevágnak az új módszerünk által biztosított adatokkal. Ezek szerint a kapott életképesség értékek jól korrelálnak az ultrastrukturális károsodás mértékével.

Köztudott tény, hogy a különböző izomrostok eltérően reagálnak az iszkémiára.⁹⁵ Habár az irodalmi adatok a témában ellentmondóak, a közlemények jelentős része a IIb típusú rostokat tartja érzékenyebbnek az iszkémiára.^{59, 90, 170, 171} Ezzel ellentétben, az általunk kapott eredmények az I-es típusú rostok fokozottabb érzékenységet jelezték. Ennek az ellentmondásnak a feloldása valószínűleg a különböző iszkémiás modellek alkalmazásában keresendő: A fent említett közlemények, melyek a IIb típusú rostok fokozott érzékenységét hivatják, komplett iszkémiát használnak. Más szerzők azonban reziduális perfúziós modellt alkalmazva az I-es típusú rostok fokozottabb károsodását vallják,⁶⁶ mely megfelel az általunk tapasztaltaknak. Mindez azt feltételezi, hogy a reziduális perfúzió megléte, vagy hiánya nagy mértékben befolyásolja az egyes izomrostok iszkémia toleranciáját. Míg a komplett iszkémia (mely során reziduális perfúzió nincs jelen) főként a IIb típusú rostok fokozott károsodását okozza, addig a reziduális perfúziós modellek az I-es típusú rostok kifejezettebb sérülésével járnak.

A reperfúzió a bevezetésben részletezettek alapján, paradox módon tovább növelheti a károsodás mértékét,^{172, 173} ezért kísérletsorozatunk második részében reperfúzió alkalmazásával vizsgáltuk tovább módszerünk szenzitivitását.

Az izomrostok életképessége a mind 8, mind 9 órás iszkémiát követő 2 órás reperfúziót követően szignifikánsan lecsökkent a megfelelő iszkémiás csoporthoz képest. A 9 órás iszkémiát követő 2 óra reperfúziós csoportban az életképesség szinte teljesen megszűnt. Az ultrastrukturális változások a reperfúzió során is alátámasztották az izomrost-életképesség vizsgálattal kapott eredményeket: a reperfúziós csoportokban nagyobb mértékű ultrastrukturális károsodás volt detektálható a megfelelő iszkémiás csoporthoz képest. A 9 órás iszkémiát követő reperfúzió során ezen felül a sejtek nagy részének nekrozisa volt megfigyelhető. A 8 órás iszkémiát követő reperfúzió során a rostok közötti különbség még detektálható volt ultrastrukturálisan, ismét az I-es típusú rostok nagyobb károsodását találtuk, melyet a mért életképesség értékek is megerősítettek. A 9 órás iszkémiát követő reperfúzió azonban olyan mértékű károsodást okozott, hogy a különbség a rostok között elmosódott. Sem az elektron mikroszkópos,

sem az izomrost életképesség vizsgálatával nem találtunk különbséget a különböző rost-típusok között.

Ezen felül az ultrastrukturális vizsgálatok szerint a 8 órás iszkémiát követő 2 órás reperfüzió, valamint a 9 órás iszkémia reperfüzió nélkül azonos mértékű károsodást okozott. Az életképesség vizsgálat képes volt megerősíteni ezt az eredményt, hiszen a két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik mért szelektív rost-életképesség tekintetében sem. A fent említett eredmények tovább erősítik módszerünk hatékonyságát a károsodás mértékének meghatározása kapcsán.

A tény, hogy a különálló rost típusok szelektív életképessége nem különbözött a rostok össz-életképességétől valamint, hogy az össz-életképesség regressziós egyenese a különálló rostok regressziós egyenese között helyezkedik el azt igazolja, hogy az izomrostok össz-életképességének vizsgálata elégséges a károsodás mértékének meghatározásához, az egyes rost típusok szelektív elkülönítése nem szükséges.

Meg kell jegyeznünk azonban, hogy habár a mi technikánk gyorsabb, mint az eddig rendelkezésre álló eljárások, a közel 1 órás mintafeldolgozás idő feltehetően még nem kellően rövid. Mivel azonban a festési eljárás kivitelezése szükségelteti a legtöbb időt, ezen szakasz hosszának minimálisra csökkentésével egy klinikailag elfogadhatóbb mintafeldolgozási idő érhető el. Annak a minimális festési időnek a meghatározására, amely mellett még hasonlóan pontos eredmények nyerhetők azonban még további vizsgálatok szükségesek a rutin klinikai alkalmazás előtt. Mindazonáltal a fagyasztott metszetek alkalmazása az életképesség meghatározáson felül egy rutin szövettani (hematoxillin-eozin) vizsgálat párhuzamos elvégzésének lehetőségét is magában hordozza, mely jelentősen hozzájárulhat a megfelelő terápiás döntéshez.

Az ultrastrukturális vizsgálataink során észlelt lipid szerű képletek további érdekességként szolgálnak. Ezen struktúrák említésére kevés alkalommal található példa az irodalomban. Az a tény, hogy a kísérletünk során észlelt inhomogén struktúrák membránnal körülvettek, valamint minden alkalommal a mitokondriumok várható helyén találhatók azt sugallja, hogy ezen struktúrák inkább mitokondrium eredetűek, mintsem az izomban jelenlévő lipidcseppek. Valószínűleg az általunk alkalmazott perfúziós fixálás a dezintegrálódott mitokondriumokat egy korábbi fázisban konzerválja, ezért láthatóak ezen képletek nagy számban metszeteken. Ezt a feltevésünket korábbi publikációk eredményei is megerősítik.^{174, 175}

Ezen hipotézist bizonyíthatná a lipidcseppek mitokondrium eredetének igazolása mitokondrium-specifikus immunhisztokémia alkalmazása, mely azonban a konvencionális technikák alkalmazása mellett nehézségekbe ütközik, az elektron mikroszkópos technika által igényelt eltérő fixálási metodikai miatt, így ennek további vizsgálatát a későbbiekben tervezzük.

Miután az általunk kifejlesztett eljárás hatékonysága állatkísérletesen igazolódott, kíváncsiak voltunk vajon az eljárásunk klinikai körülmények között is hatásosnak bizonyul-e.

Ennek érdekében előkészítettünk egy klinikai vizsgálatot, melybe az I. sz. Sebészeti Klinikára akut alsó végtagi iszkémia iránydiagnózissal küldött betegeket vontuk be. Annak érdekében, hogy a módszer alkalmasságának teszteléséhez a körülményeket a lehető legnagyobb mértékben standardizáljuk, az említett beteganyagból az arteria femoralis superficialis elzáródással rendelkező eseteket válogattuk ki. Azon betegeket, akiknek ennél proximálisabban, vagy disztálisabban igazolódott érelzáródás kizártuk a vizsgálatból. Erre a már említett reziduális perfúzió standardizálása okán került sor. Mind a disztálisabb elzáródás során jelentkező csökkent reziduális perfúzió, mind a proximális elzáródás során fennmaradó nagyobb mértékű reziduális perfúzió jelentősen befolyásolhatta volna az iszkémiás károsodás mértékét. Kizártuk továbbá a bilaterális okklúziós eseteket, hiszen ezen károsodás nagyobb szisztémás hatásai révén a mortalitási és morbiditási mutatókra lehetett volna kifejezett hatással. További kizárási kritérium volt az elégtelen disztális perfúzió, hiszen a revaszkularizációt követően a disztális perfúzió nem elégséges volta az izmok iszkémiás reperfüziós károsodására jelentős hatást gyakorolhat.

Jelen humán vizsgálatunkban a 30 napos mortalitás 21%-os volt, míg a 30-napos amputációs ráta 37%-nak adódott. Nagy betegpopulációkon történt vizsgálatok alapján az alsó végtagi iszkémia mortalitása 15-30%-os,⁵¹ míg a posztoperatív végtagvesztés gyakorisága 40% körüli,⁵⁴ mely mutatók összhangban vannak jelen vizsgálatunk eredményeivel. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy egyes újabb, habár kisebb elemszámú vizsgálatok kedvezőbb eredményekről is beszámolnak (mortalitás: 9,2%, végtagvesztés: 29%),¹⁷⁶ továbbá hogy az általunk végzett vizsgálat egy jelentősen szelektált betegpopuláció adatait értékeli, amit az epidemiológiai adatok elemzése során figyelembe kell venni, ezen adatok interpretációja tehát nagy körültekintést igényel.

A vizsgálatba bevont betegek 86,8%-án volt megkísérelhető a revaszkularizáció, míg 13,2%-ban primere amputációt voltunk kénytelenek végrehajtani. A revaszkularizáció 72,7%-ban volt sikeres a fennmaradó esetekben a végtag romló keringési státusza következtében szekunder amputációra kényszerültünk.

A műtét közben izom-biopsziákat vettünk rutin szövettani feldolgozás, valamint izomrost életképesség meghatározás céljából. A kontrollként alkalmazott m. pectineus metszetein összességében iszkémiás-reperfúziós károsodás jelei nem voltak láthatóak. A krónikus iszkémiás csoportok kontroll mintáiban enyhe, atrófiás elváltozások voltak megfigyelhetők, melyek a krónikus iszkémia jeleiként foghatók fel, ismert verőérbetegséggel rendelkező páciensek esetén ez gyakori jelenség.¹⁷⁷

Eredményeink szerint az sikeres revaszkularizációs csoportok (A1 és B1 csoportok) iszkémiás mintáin, csekély mértékű szövettani károsodás látható, megtartott életképesség értékek mellett. Ezen csoportokban a betegség kimenetele is kedvező volt. Azokban a csoportokban, melyekben később szekunder amputációra kényszerültünk már a revaszkularizációt megelőzően is nagyobb mértékű szövettani károsodás figyelhető meg, amely jelentős életképesség csökkenéssel párosult. Az amputált végtagok vizsgálata során a jelentős mértékű nekrozishoz még kifejezettebb életképesség csökkenés társult, mely klinikai szituációban is alátámasztja módszerünk hatékonyságát. Ehhez még inkább hozzájárul az a tény, hogy az azonos klinikai kimenetellel bíró csoportok között az életképesség értékekben szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a kapott életképesség értékek szoros korrelációban vannak a betegség kimenetelével.

Eredményeink azt mutatják, hogy a magas életképesség értékek (75% felett) kismértékű szövettani károsodással és jó prognózissal járnak, míg a nagyon alacsony életképesség (35% alatt) a szövettani izomnekrozis, így az irreverzibilis károsodás jó jelzője. Ezek alapján a módszer klinikai környezetben is jól alkalmazhatónak tűnik.

Humán vizsgálatunk során kapott eredmények ugyan felettebb biztatóak a teljesség kedvéért meg kell azonban említenünk azon korlátozó tényezőket, melyek eredményeink gyakorlati adaptálhatóságát korlátozzák. Az első ilyen korlátozó tényező a korábban már említett mintafeldolgozási idő. Valószínűsíthető, hogy az eljárás jelen állapotában még rutin klinikai alkalmazásra nem alkalmas, a mintafeldolgozási idő csökkentése ezért a későbbiekben nagy jelentőséggel bír. További limitáló tényező a

vizsgálatba bevont betegek csekély száma, mely kiemelkedően jelentkezik az egyes alcsoportok esetében, valamint a tény, hogy egy ellátási helyről történt az adatgyűjtés. Habár a jelen vizsgálatban kapott eredmények biztatóak, és feltehetőleg nagyobb betegszám vizsgálata során sem várható ettől eltérő kimenetel, az eljárás klinikai diagnosztikai eljárásként való végső bevezetése előtt azonban mindenképp nagy beteganyagon történő, multicentrikus vizsgálatok szükségesek, a technika hatékonyságának kétséget kizáró igazolására.

További problémát jelenthet, hogy az egyes izomrostok eloszlása külső hatásokra változhat. Egyes szerzők eredményei szerint a krónikus iszkémia megváltoztatja az egyes izmok izomrost összetételét,^{104, 178-182} ugyanakkor más szerzők azt vallják, hogy ezen állapotnak egyáltalán nincs hatása a rost-összetételre.¹⁷⁷ Ugyan mindezek alapján kétséget kizáró konklúzió nem vonható le, ezen tényező esetleges befolyásoló hatását sem kívántuk kihagyni a diszkusszióból. Hasonló helyzet áll fent az életkor esetében is, melynek növekedése szintén hatással lehet az izomrostok eloszlási arányára.¹⁷⁷ Az említett korlátozó tényezők okán vizsgálatunk eredményeinek interpretációja során megfelelő körültekintéssel kell eljárunk.

A súlyos szövödmények kialakulási valószínűségének csökkentére másik lehetőségként kínálkozik a már kialakult károsodás kiterjedésének mérséklése. A károsodás mértékét csökkentő eljárások segítségével az iszkémiás tolerancia idő kitolható, ezzel mind a megmenthető végtagok száma, mind a betegek életminősége növelhető, a fatális kimenetelű események száma pedig csökkenthető.

Az iszkémiás-reperfúziós károsodások mértékének mérséklésére akut végtagi elzáródások esetén az egyik legígéretesebbnek tűnő eljárás az úgynevezett posztkondicionálás. Az eljárás lényege, hogy az iszkémia megszűnését követően rövid, repetitív reperfúziós-reokklúziós ciklusok kerülnek alkalmazásra, melyek IR károsodás csökkentő hatással bírnak.¹⁸³ A módszer hatékonyságát eddig főként szív vonatkozásában igazolták,¹²⁹ az eljárás izomszövettel kapcsolatos hatásaival a dolgozat megírásáig alig több, mint tíz közlemény foglalkozott (lásd bevezetés). Ezen közlemények egyike sem vizsgálja azonban a sebésztechnikai manőver károsodás csökkentő hatásait akut klinikai szituációt modellező, hosszú iszkémiás időket alkalmazva. Ezen tanulmányok továbbá nem nyújtanak információt a posztkondicionálás hatásainak időbeliségét tekintve. Ennek okán célunk volt a

poszt kondicionálás alsó végtagi izomszövetre gyakorolt befolyásának vizsgálata hosszú idejű, akut végtagi elzáródás modellező kísérleti elrendezésben, valamint a kedvező hatások időbeli dinamikájának feltérképezése.

Kísérleteink alapján a 8 órás hosszúságú iszkémia bizonyult annak a legrövidebb klinikailag is releváns időtartamnak, mely már kellő mértékű, de még feltehetőleg reverzibilis károsodások okoz az izomszövetben, ezért ezt az iszkémiás intervallumot választottuk vizsgálataink tárgyának.

Állatkísérletes vizsgálatunk során 8 órás iszkémiát követően súlyos eltérést nem láttunk a szövettani metszeteken. Azt követő 2 órás reperfúzió, ugyan a szövettani károsodás mértékét enyhén növelte, súlyos, végtagot veszélyeztető elváltozások ezen időpillanatban sem voltak megfigyelhetők. Ismert azonban, hogy a szövettani eltérések időben később válnak csak megfigyelhetővé fénymikroszkópos vizsgálatokkal.¹⁵⁵ Egyes szerzők ugyan leírják enyhe morfológiai változásokat már 5 perc reperfúzió után is, azonban a nekrotikus rostok megjelenése a rutin szövettani metszeteken akár öt órát is igénybe vehet.¹⁸⁴ A mi kísérleteink során a nekrotikus rostok megjelenését először 6 órás reperfúziót követően észleltük. A károsodás mértéke a posztoperatív 12. óráig fokozatosan növekedett, majd a nekrotikus rostok mennyisége a posztoperatív első napig azonos maradt. Ezen eredmények megfeleltethetők korábbi tanulmányok eredményeinek,^{30, 75} melyek a szövettanilag detektálható károsodás maximális mértékének elérését szintén a posztoperatív 12. órára teszik.

A poszt kondicionálás szövettani károsodást csökkentő hatása korábbról ismert izomszövet esetében különböző modelleken, azonban rövidebb iszkémiás idők alkalmazása mellett.^{130, 131} Jelen kísérletünk elsőként igazolta, hogy a poszt kondicionálás képes csökkenteni a szövettani károsodás mértékét hosszú idejű végtagi kirekesztést követően is. A poszt kondicionálás izomszöveti károsodásra kifejtett hatását az elvégzett életképesség vizsgálatok is tovább igazolták. Iszkémia-reperfúziót követően az életképesség 15%-ra esett vissza már a reperfúzió második órájának végén, majd az egész kísérlet során állandó maradt. A poszt kondicionálás képes volt szignifikánsan javítani az izomrostok össz-életképességén minden vizsgált időpontban.

Előző kísérletünk alapján ismert volt, hogy 2 órás reperfúziót követően a kifejezett életképesség csökkenés megfelelő ultrastrukturális eltérésekkel társul, jelentősebb fénymikroszkópos eltérések nélkül. A poszt kondicionált csoportban az

életképesség értékek szignifikánsan magasabbnak találtattak 2 órás reperfúziót követően, az IR csoporthoz képest, azonban ez a különbség nem jelent meg a szövettani vizsgálatok során. Tekintettel arra, hogy korábbi kísérletünk során az életképesség vizsgálat és az elektronmikroszkópia által nyújtott eredmények szoros összefüggést mutattak, valamint arra, hogy az ultrastrukturális változások időben jóval korábban detektálhatók,¹⁸⁵ elektron mikroszkópos vizsgálatot is elvégeztünk ezen időpontban, a csoportok közötti finom különbségek feltérképezésére. Minthogy a későbbi reperfúziós időpontokban a csoportok közötti különbség jól elkülöníthető szövettanilag is, további ultrastrukturális vizsgálatokat nem tartottunk szükségesnek.

Az elvégzett elektron mikroszkópos vizsgálat megerősítette korábbi kísérletünk során kapott eredményünket, mely szerint a 8 órás iszkémiát követő 2 órás reperfúziós súlyos károsodásokat okozott az izomsejt szerkezetében. A poszt kondicionálás azonban képes volt mérsékelni az intracelluláris károsodás mértékét, az életképesség eredményeknek megfelelően. Ezzel nemcsak a poszt kondicionálás hatékonyságát sikerült igazolunk az ultrastrukturális károsodás csökkentésére, hanem tovább igazoltuk életképesség meghatározó módszerünk alkalmasságát is.

A szövettani vizsgálatok alapján egy további, érdekes megfigyelést tettünk. A szövettani metszetek pontozása kapcsán a posztoperatív első napon a sérülés morfológiai jegyeit nem mutató rostok aránya az IR csoportban 20%, míg a poszt kondicionált csoportban 40% környékén volt. Érdekes módon az életképesség vizsgálatok igen hasonló eredményt hoztak. Az életképesség tekintetében a kapott százalékos érték azonban már a posztoperatív második órában megfigyelhetővé váltak. Ezek alapján feltételezhető, hogy az életképesség vizsgálat képes lehet előre vetíteni a szövettani károsodás végső kiterjedését akár már 2 órás reperfúziót követően is.

Revaszkularizációt követően az izomkárosodás fokának egy jól használható klinikai paramétere a szérum kreatin-kináz szintje. Habár a károsodás mértékének pontos megállapítására nem alkalmas, változásának regisztrálása kórjelző lehet.⁷⁷ Jelen kísérletünkben a szérum CK szintjei már a posztoperatív második órában megemelkedtek, csúcsukat a reperfúziót követő hatodik órában érték el, majd az első nap végére az áloperált csoport értékeinek szintjére csökkentek vissza. Habár a szérum CK szintjeinek megemelkedése a korai fázisban ismert,^{77, 142} az általunk tapasztalt felszabadulási-kiürülési dinamika eltér a korábbi tanulmányok eredményeitől. Az

irodalomban fellelhető adatok szerint a szérumban CK koncentrációi a maximumukat általában az inzultust követő 12. órában érik el,¹⁴⁵ majd emelkedett szinten maradnak az első néhány napon.^{77, 143} Az eltérés a mi eredményeink és az irodalomban találhatóak között feltehetőleg az eltérő állatmodellekben keresendő. Az általunk alkalmazott hosszú idejű iszkémia olyan súlyos fokú, irreverzibilis károsodást okozhat, mely az izomrostok nagy részének hirtelen halálához vezet. A nagy mennyiségű elhalt izomrostból ezután nagy mennyiségű CK szabadul fel, mely korán eléri a csúcspontját, majd a felszabadulás kimerül a további rendelkezésre álló enzim hiányában. A reperfüzió későbbi szakaszában tehát további enzim felszabadulni már nem képes, így mennyisége a reperfüzió előrehaladtával folyamatosan csökken. Ezzel ellentétben a korábbi vizsgálatok során egy kisebb mértékű izomkárosodás lehetett jelen, mely kapcsán a rostok a reperfüzió során fokozatosan pusztultak el, így a CK felszabadulás is elnyújtott lehetett. Jelen hipotézisünket alátámasztják az életképesség és az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei, melyek már a posztoperatív második órában igen súlyos izomkárosodást jeleztek.

A posztoperatív szérumban CK szintjeire kifejtett kedvező hatása ismert volt rövidebb iszkémiás idők tekintetében,¹³⁵ egyetlen mérési pont kapcsán. Hosszú idejű iszkémiás idők esetén azonban jelen tanulmányunk az első, mely igazolja az eljárás szérumban CK szint csökkentő hatását. Ezen felül kísérletünk az első, mely betekintést nyújt a posztoperatív hatásaira a CK felszabadulás időbeli dinamikájának tekintetében.

A reperfüzió során a bevezetésben ismertetett módon gyulladásos folyamatok is kialakulhatnak, melyek főként a lokális károsodás direkt következményei.¹⁷² A reperfüzió során létrejövő változások egyik jellemzője a reaktív oxigénradikálok termelődésének növekedése, mely elősegíti a gyulladásos sejtek aktivációját (lásd bevezetés). Az aktivált gyulladásos sejtek ezután a sérülés helyén akkumulálódnak,¹⁸⁶ így jelenlétük a sérült szövetben gyakori jelenség. Izomszövet iszkémiás károsodása kapcsán a gyulladásos sejtek általában a reperfüziót követő 6-12. órában jelennek meg,^{75, 187, 188} a gyulladásos folyamat a posztoperatív 3 nap után kezd mérséklődni,¹⁶⁵ azonban általában az első hét végéig a folyamat kisebb mértékben fennmarad.^{75, 147, 188}

Jelen kísérletünk során a gyulladásos sejtek megjelenése a posztoperatív 12. órában volt megfigyelhető, mely a vizsgált periódus végéig fennmaradt, ezen

eredmények a korábban említetteknek megfelelőek. A posztkondicionálás kísérletünk során képes volt a gyulladásos reakció mérséklésére, mely összecseng a korábban rövidebb iszkémiás idők alkalmazása során tapasztaltakkal.¹³⁰⁻¹³²

A szövet nedvességtartalmának változása szorosan összefügg a reperfúziós károsodással, valamint a szöveti gyulladással. Iszkémiás-reperfúziós károsodást követően a szöveti nedvességtartalom már 30 perc után megemelkedhet,¹⁸⁴ majd akár 2 héten keresztül is magas maradhat.⁸³ Ezen irodalmi adatoknak megfelelően, jelen kísérletünkben a szöveti nedvességtartalom kismértékű megemelkedését már 2 órás reperfúzió után tapasztaltuk. A szöveti ödéma csúcsát a reperfúzió hatodik órájának végére érte el, majd azonos szinten marad a kísérlet végéig. A posztkondicionálás ugyan a kezdeti fázisban (2 órás reperfúziót követően) nem volt képes a kialakuló ödéma mértékét mérsékelni, azonban a posztoperatív hatodik óra után az ödéma-formáció dinamikájának megváltoztatásával már képes volt a szövet nedvességtartalmát csökkenteni. Ugyan korábban a posztkondicionálás szöveti ödéma csökkentő hatását már igazolták rövidebb iszkémiás idők tekintetében,¹³¹⁻¹³³ a posztkondicionálás a szöveti ödéma keletkezésének időbeli dinamikáját megváltoztató hatását jelen kísérletünk fedte fel elsőként.

A reperfúzió első 2 órájában vizsgáltuk továbbá a végtag mikrocirkulációs áramlását. A későbbi mintavételi időpontokban a felébresztett állatok mozgásának áramlást befolyásoló hatása (lásd fent), valamint a fej hosszú távú rögzítésének, illetve azon pontra való visszahelyezhetőségének lehetetlensége a mikrocirkulációs változások hosszú távú követését lehetetlenné tette. A reperfúzió első 2 órája során szerzett adatok alapján azonban látható, hogy ezen hosszú idejű iszkémiás időtartamot követő reperfúzió a végtag mikrokeringésének helyreállítása nem volt képes. A posztkondicionálás ezzel szemben képes volt a kapillárisok áramlásának javítására.

Összefoglalva elmondható, hogy a dolgozat egy új eljárás alkalmazását mutatja be, mely a kapott eredmények alapján megfelelő érzékenységgel képes megállapítani az iszkémiás károsodás mértékét. Ezen eredmények nagy klinikai jelentőséggel bírhatnak, hiszen a károsodás mértékének pontos meghatározásával a betegek életminősége javítható, a súlyos szövődmények előfordulási valószínűsége, illetve a mortalitás pedig csökkenthető lenne. Ugyan az eljárás jelen stádiumban kevésbé alkalmas intraoperatív, esetleg betegágy melletti diagnosztikus eszköznek, azonban a megfelelő módosítások

elvégzését követően nagy segítséget nyújthat a gyors és pontos diagnózishoz, illetve a megfelelő terápiás döntéshez.

A pontos diagnózison túl, főként igen súlyos esetekben, a súlyos szövődmények terápiás lehetőségeinek elégtelen volta okán, a károsodás mértékét csökkenteni képes eljárások is nagy szerepet kaphatnak a jövőben. A poszt kondicionálás egy egyszerűen alkalmazható sebésztechnikai eljárás, mely jelen dolgozat eredményei szerint, hosszú idejű verőér-elzáródások esetén is hatékony eszköz lehet az iszkémiás-reperfúziós károsodások mértékének mérséklése, melynek klinikai jelentősége vitathatatlan.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése egy komplett iszkémiás modellhez (pl. külső leszorítás, tourniquet alkalmazása) képest ugyan szignifikánsan kisebb mértékű károsodást hoz létre, azonban rövid iszkémiás időtartamok alkalmazása esetén is jelentős károsodás detektálható az aortakirekesztés következtében.
2. Aortakirekesztés következtében a végtagok áramlása jelentősen lecsökken, körülbelül az alapáramlás 20%-ára, mely irodalmi adatok szerint elegendő egy megfelelő mértékű károsodás létrehozásához. Ezt a saját eredményeink is megerősítik. Tekintettel, hogy a végtagok áramlása 9 órás iszkémiás időtartam alatt sem változik szignifikánsan, kijelenthetjük, hogy a modell jól használható tartós, megfelelő mértékű iszkémia indukciójára. A reziduális áramlás hátterében elülső hasfali (epigasztrikus, mediális és laterális valamint dorzális kollaterális rendszerek tarthatók fel, valamint az eddig ismeretlen gerincvelői anasztomózisok is nagy jelentőséggel bírhatnak.
3. Az iszkémiás időtartam növekedésével az elektronmikroszkópiával megfigyelhető ultrastrukturális változások egyre súlyosabb iszkémiás károsodást jeleznek. 9 órás iszkémiát követően már nemcsak a mitokondriumokban, hanem egyéb szubcelluláris struktúrákban is megfigyelhető a károsodás. Fénymikroszkópiával ezzel szemben a károsodás egyértelmű jelei csak 9 órás iszkémiát követően válnak láthatóvá.
4. Az irodalmi adatokkal ellentétben, az általunk alkalmazott modellben az I-es típusú (lassú összehúzódásra képes, oxidatív) rostok fokozottabb érzékenységet találtuk, melyre az alkalmazott kísérleti modellek közötti eltérés adhat magyarázatot.

5. Az izomrost életképesség vizsgálat eredményeink szerint magas érzékenységgel képes a kialakult iszkémiás károsodás mértékét meghatározni, hiszen a módszer által biztosított értékek jól korrelálnak mind az iszkémia hosszával, mind az elektron mikroszkópos vizsgálatok során látott változásokkal.
6. A rövid reperfúzió (2 óra) vizsgálata során kapott eredmények tovább erősítik az általunk alkalmazott eljárás hatékonyságát. Módszerünk nemcsak a reperfúzió során kialakuló károsodás növekedését volt képes megfelelően jelezni, hanem hasonló mértékű ultrastrukturális károsodások esetén hasonló értékeket volt képes biztosítani.
7. Az általunk kifejlesztett izomrost életképesség vizsgálat az elektronmikroszkópos felvételeken látottaknak megfelelően volt képes jelezni az izomrost típusok között fennálló különbségeket. Az I-es típusú rostok az eljárás szerint szignifikánsan nagyobb mértékű károsodást szenvedtek.
8. Klinikai vizsgálataink során az izomrost életképességet vizsgáló eljárás eredményeink szerint megfelelően képes jelezni a szövettani károsodás mértékét, hiszen enyhe károsodás esetén alacsony, közepes károsodás esetén közepes, míg súlyos károsodás esetén kifejezett életképesség csökkenés volt tapasztalható.
9. A poszt kondicionálás eredmények szerint képes megfelelően megbecsülni az akut végtagi iszkémia klinikai kimenetelét, hiszen a magas életképesség értékek pozitív klinikai kimenetellel voltak összekapcsolhatók, míg a csökkent életképesség értékek esetén a végtagok megtarthatósága hosszú távon nem vált lehetségessé.
10. A poszt kondicionálás 8 órás iszkémiás időtartamot követően is képes volt a fénymikroszkóposan detektálható szövettani károsodás mérséklésére a posztoperatív hatodik órát követően.

11. Az általunk alkalmazott sebésztechnikai eljárás az izomrostok életképességének tekintetében is kedvező hatásokkal rendelkezik az alkalmazott hosszú iszkémiás időtartamot követően.
12. A poszt kondicionálás jelen kísérleti elrendezésben képes volt mind a lokális gyulladás, mind az ennek következtében fellépő szöveti ödéma kialakulásának mérséklésére.
13. A poszt kondicionálás a szövettanilag sérültnek mutató izomrostok aránya, az izomrostok életképessége, valamint a szérumban a kreatinin koncentrációk tekintetében, képes volt ugyan szignifikánsan csökkenteni ezen paramétereket, az időbeli dinamikájukat azonban nem befolyásolta az iszkémiás-reperfúziós csoporthoz képest. A szöveti nedvességtartalom tekintetében azonban az eljárás feltehetően az időbeli dinamika megváltoztatásán keresztül volt képes az ödéma mértékének mérséklésére.

A dolgozat új megállapításai

1. Infrarenális aortakirekesztést követően az izomszövet reziduális perfúziójának biztosításához eddig nem ismert kollaterális hálózatok is hozzájárulnak, melyek a dolgozatban feltárássra kerültek.
2. A reziduális perfúzió megfelelően standardizált körülmények mellett konstans szinten tartható.
3. Az izomrost-életképesség vizsgálata az elektronmikroszkópos vizsgálatok hatásfokával megegyező mértékben képes az izomkárosodás mértékének megállapítására.
4. A posztkondicionálás képest az izomszövet lokális károsodásának mértékét csökkenteni hosszan tartó alsó végtagi iszkémiát követően is.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: Az alsó végtagi akut verőér-kirekesztések magas mortalitásuk és szövődmény-rátájuk okán nagy klinikai jelentőséggel bírnak. A súlyos szövődmények kialakulási valószínűségének mérséklésére az egyik elméleti lehetőség a károsodás mértékének pontos, gyors megállapítása, míg másik lehetőségként a már kialakult sérülés kiterjedésének mérséklése merül fel.

Célkitűzés: Célunk volt egy az alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodások mértékének pontos, klinikailag releváns meghatározására alkalmas módszer kifejlesztése, értékelése, valamint egy új eljárás a poszt kondicionálás hatékonyságának vizsgálata az iszkémiás reperfúziós sérülések kiterjedésének mérséklésében.

Anyagok és Módszerek: Kísérleteinket hím Wistar patkányokon végeztük. Előkísérletünkben az általunk vizsgálni kívánt modell hatékonyságát ellenőriztük, majd első körben növekvő iszkémiás idők során vizsgáltuk az izomrostok életképességét meghatározni képes módszerünk hatékonyságát a rutin szövettani, valamint elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz képest. Második ütemben pedig a poszt kondicionálás alkalmazásának hatékonyságát vizsgáltuk szövettani, vérkémiai, valamint ödéma mértékét meghatározó módszerek segítségével. Módszerünk hatékonyságát továbbá klinikai körülmények között is teszteltük.

Eredmények: Az általunk alkalmazott infrarenális aortakirekesztés a klinikai szituációk modellezési képességének megtartása mellett megfelelő mértékű károsodás előidézésére képes. Az általunk bevezetett izomrost-életképesség vizsgálat megfelelő hatékonysággal képes meghatározni az izomkárosodás mértékét mind kísérletes, mind klinikai körülmények között, továbbá a klinikai kimenetellel kapcsolatban is kedvező eredmények nyerhetők. A poszt kondicionálás képes a hosszú idejű akut végtagi verőér-elzáródások kapcsán kialakuló sérülések kiterjedésének mérséklésére.

Következtetés: Az izomrostok életképességének vizsgálata, valamint a poszt kondicionálás alkalmazása megfelelő eljárások lehetnek az akut alsó végtagi verőér-elzáródásokat követő súlyos szövődmények kialakulási valószínűségeinek mérséklésére.

9. SUMMARY

Introduction: Acute lower extremity ischemic scenarios represent a serious clinical problem due to their high mortality and complications rates. To reduce the probability of the development of the severe complication the precise degree of the ischemic injury must be determined rapidly, or the degree of the acquired injury might be limited.

Aim: Our aim was to develop and evaluate a new technique which is able to determine the precise degree of acute ischemic muscle injury under a clinically relevant time frame, and to the ability of the procedure postconditioning in limiting the degree of such an injury.

Materials and Methods: Experimental studies were performed on male Wistar rats. During our preliminary examinations we validated the suitability of our model setting, thereafter we investigated the feasibility of our model in determining the degree of muscle injury during increasing periods of ischemia compared with histologic and electron microscopic methods. In a second phase we tested capability of postconditioning in reducing ischemic injury by histologic, laboratorial and edema evaluating techniques. A human study was also performed to assess the feasibility of our new technique.

Results: Infrarenal aortic occlusion is a method suitable to model acute clinical ischemic scenarios. Our muscle fiber viability determining method is able to accurately assess the degree of ischemic injury in experimental, as well as clinical settings, furthermore it provides reliable information regarding the clinical outcome. Postconditioning is able to reduce the degree of ischemic injury after acute lower extremity ischemic scenarios.

Conclusion: Determining muscle fiber viability or the application of postconditioning might be reliable methods to reduce the probability of the development of the serious, even life-threatening complication of acute lower limb ischemia.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Cohen MV, Yang XM, Liu Y, Solenkova NV, Downey JM. (2010) Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299 (6): H2028-2036.
2. Cunha MS, da Silva JC, Nakamoto HA, Ferreira MC. (2005) Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. *Clinics (Sao Paulo)*, 60 (3): 213-220.
3. Wiegand N, Várhidy L, Patczai B, Dömse E, Kereskai L, Lőrinczy D. (2009) Differential scanning calorimetric examination of the human skeletal muscle in a compartment syndrome of the lower extremities. *J Therm Anal Calorim*, 98: 177-182.
4. Blebea J, Kerr JC, Shumko JZ, Feinberg RN, Hobson RW. (1987) Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res*, 43 (4): 311-321.
5. Collard CD, Gelman S. (2001) Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94 (6): 1133-1138.
6. Kharbanda RK. (2010) Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury. *Heart*, 96 (15): 1179-1186.
7. Reffellmann T, Kloner RA. (2002) The "no-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart*, 87 (2): 162-168.
8. Ogata T, Yamasaki Y. (1997) Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec*, 248 (2): 214-223.
9. Picard-Ami LA, Jr., Thomson JG, Kerrigan CL. (1990) Critical ischemia times and survival patterns of experimental pig flaps. *Plast Reconstr Surg*, 86 (4): 739-743; discussion 744-735.
10. Labbe R, Lindsay T, Gatley R, Romaschin A, Mickle D, Wilson G, Houle S, Walker P. (1988) Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: histochemical and radioisotope techniques. *J Surg Res*, 44 (1): 45-53.
11. Proudfoot AG, Hind M, Griffiths MJ. (2011) Biomarkers of acute lung injury: worth their salt? *BMC Med*, 9: 132.

12. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. (1994) Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 19 (4): 623-631.
13. Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N, Romaschin AD. (1986) Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol*, 250 (2): H213-H220.
14. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. (2002) Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 105 (2): 248-258.
15. Szijártó A, Arányi P, Turóczy Z, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2009) Ischaemiás-reperfúziós károsodás csökkentésének gyakorlati és elvi lehetőségei az érsebészetben. *Érbetegségek*, 16 (4): 113-120.
16. Sinay L, Kurthy M, Horvath S, Arato E, Shafiei M, Lantos J, Ferencz S, Bator A, Balatonyi B, Verzar Z, Suto B, Kollar L, Weber G, Roth E, Jancso G. (2008) Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model. *Clin Hemorheol Microcirc*, 40 (2): 133-142.
17. Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. (2000) Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 92 (1): 1-6.
18. Babior BM, Peters WA. (1981) The O₂--producing enzyme of human neutrophils. Further properties. *J Biol Chem*, 256 (5): 2321-2323.
19. Dykens JA. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem*, 63 (2): 584-591.
20. Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. (2001) Oxidative stress in Ca(2+)-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem*, 79 (6): 1237-1245.
21. Fehér J, Vereckei A. Szabadgyök reakciók jelentősége az orvostudományban, Medicina: Budapest, 1985.
22. Arato E, Jancso G, Sinay L, Kurthy M, Lantos J, Ferencz S, Horvath S, Shafiei M, Kasza G, Verzar Z, Kollar L, Roth E, Weber G, Menyhei G. (2008) Reperfusion injury and inflammatory responses following acute lower limb revascularization surgery. *Clin Hemorheol Microcirc*, 39 (1-4): 79-85.

23. Brasier AR. (2010) The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, 86 (2): 211-218.
24. Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 (Pt 2): 233-249.
25. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. (1998) Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene*, 17 (25): 3341-3349.
26. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 8 (5-6): 691-728.
27. Rodrigues SF, Granger DN. (2010) Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*, 87 (2): 291-299.
28. Davies MG, Juynh TTT, O. HP. Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT (eds). *Ischemia-reperfusion injury*, Blackwell Science: London, 1999, pp 157-179.
29. Seal JB, Gewertz BL. (2005) Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*, 19 (4): 572-584.
30. Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. (2001) Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg*, 107 (3): 785-788.
31. Vrints CJ. (2009) Pathophysiology of the no-reflow phenomenon. *Acute Card Care*, 11 (2): 69-76.
32. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. (1997) Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice. *Am J Physiol*, 273 (6 Pt 2): H2721-2725.
33. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. (2007) Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 38 (12): 1336-1345.
34. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. (2008) Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm*, 2008: 135625.
35. Matsen FA, Winkquist RA, Krugmire RB. (1980) Diagnosis and management of compartmental syndromes. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 62 (2): 286-291.

36. Tiwari A, Haq AI, Myint F, Hamilton G. (2002) Acute compartment syndromes. *Br J Surg*, 89 (4): 397-412.
37. Curry SC, Chang D, Connor D. (1989) Drug- and toxin-induced rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med*, 18 (10): 1068-1084.
38. Dinarello CA. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2): 503-508.
39. Holzheimer RG, Gross J, Schein M. (1999) Pro- and anti-inflammatory cytokine-response in abdominal aortic aneurysm repair: a clinical model of ischemia-reperfusion. *Shock*, 11 (5): 305-310.
40. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 96 (1): 60-68.
41. Montgomery RA, Venbrux AC, Bulkley GB. (1997) Mesenteric vascular insufficiency. *Curr Probl Surg*, 34 (12): 941-1025.
42. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. (1992) Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest*, 90 (2): 389-398.
43. Kelly RA, Smith TW. (1997) Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation*, 95 (4): 778-781.
44. Kale IT, Kuzu MA, Berkem H, Berkem R, Acar N. (1998) The presence of hemorrhagic shock increases the rate of bacterial translocation in blunt abdominal trauma. *J Trauma*, 44 (1): 171-174.
45. Kunkel SL, Strieter RM. (1990) Cytokine networking in lung inflammation. *Hosp Pract (Off Ed)*, 25 (10): 63-66, 69, 73-66.
46. Boyd AJ, Rubin BB, Walker PM, Romaschin A, Issekutz TB, Lindsay TF. (1999) A CD18 monoclonal antibody reduces multiple organ injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Am J Physiol*, 277 (1 Pt 2): H172-182.
47. Scharman EJ, Troutman WG. (2013) Prevention of kidney injury following rhabdomyolysis: a systematic review. *Ann Pharmacother*, 47 (1): 90-105.
48. Cushner HM, Barnes JL, Stein JH, Reineck HJ. (1986) Role of volume depletion in the glycerol model of acute renal failure. *Am J Physiol*, 250 (2 Pt 2): F315-321.

49. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. (2004) Crush injury and rhabdomyolysis. *Crit Care Clin*, 20 (1): 171-192.
50. Shulman LM, Yuhas Y, Frolkis I, Gavendo S, Knecht A, Eliahou HE. (1993) Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Kidney Int*, 43 (6): 1397-1401.
51. Creager MA, Kaufman JA, Conte MS. (2012) Acute limb ischemia. *N Engl J Med*, 366 (23): 2198-2206.
52. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, Grp TIW. (2007) Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 45: S40-S47.
53. Earnshaw JJ, Whitman B, Foy C. (2004) National Audit of Thrombolysis for Acute Leg Ischemia (NATALI): clinical factors associated with early outcome. *J Vasc Surg*, 39 (5): 1018-1025.
54. Pemberton M, Varty K, Nydahl S, Bell PRF. (1999) The surgical management of acute limb ischaemia due to native vessel occlusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 17 (1): 72-76.
55. Ljungman C, Adami HO, Bergqvist D, Berglund A, Persson I. (1991) Time trends in incidence rates of acute, non-traumatic extremity ischaemia: a population-based study during a 19-year period. *Br J Surg*, 78 (7): 857-860.
56. Sjostrom M, Neglen P, Friden J, Eklof B. (1982) Human skeletal muscle metabolism and morphology after temporary incomplete ischaemia. *Eur J Clin Invest*, 12 (1): 69-79.
57. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, Jones DN. (1997) Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version. *J Vasc Surg*, 26 (3): 517-538.
58. Rutherford RB. (2009) Clinical staging of acute limb ischemia as the basis for choice of revascularization method: when and how to intervene. *Semin Vasc Surg*, 22 (1): 5-9.
59. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. (2012) The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*, 43 (6): 670-675.
60. Harman JW. (1947) A Histological Study of Skeletal Muscle in Acute Ischemia. *Am J Pathol*, 23 (4): 551-565.

61. Makitie J, Teravainen H. (1977) Ultrastructure of striated muscle of the rat after temporary ischemia. *Acta Neuropathol*, 37 (3): 237-245.
62. McCormack MC, Kwon E, Eberlin KR, Randolph M, Friend DS, Thomas AC, Watkins MT, Austen WG, Jr. (2008) Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury. *Surgery*, 143 (1): 126-133.
63. Newman RJ. (1984) Metabolic effects of tourniquet ischaemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Bone Joint Surg Br*, 66 (3): 434-440.
64. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. (1999) The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg*, 178 (2): 147-150.
65. Labbe R, Lindsay T, Walker PM. (1987) The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J Vasc Surg*, 6 (2): 152-157.
66. Racz IB, Illyes G, Sarkadi L, Hamar J. (1997) The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res*, 29 (4): 254-263.
67. Brandao ML, Roselino JE, Piccinato CE, Cherri J. (2003) Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res*, 110 (1): 235-240.
68. Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA. (1978) Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol*, 92 (1): 187-214.
69. Farber JL, Chien KR, Mitnacht S. (1981) The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol*, 102 (2): 271-281.
70. Novikoff AB, Shin WY, Drucker J. (1961) Mitochondrial localization of oxidative enzymes: staining results with two tetrazolium salts. *J Biophys Biochem Cytol*, 9: 47-61.
71. Knight KR, Zhang BM, Morrison WA, Stewart AG. (1997) Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J Pharmacol*, 332 (3): 273-278.

72. Belkin M, Brown RD, Wright JG, Lamorte WW, Hobson RW. (1988) A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*, 156 (2): 83-86.
73. Powell RJ, Cronenwett JL, Gauthier AJ, Wagner RJ. (1995) Quantitating intestinal ischemia with nitroblue tetrazolium salts. *J Surg Res*, 58 (4): 359-366.
74. Madesh M, Bhaskar L, Balasubramanian KA. (1997) Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem*, 167 (1-2): 81-87.
75. Hickey MJ, Hurley JV, Angel MF, O'Brien BM. (1992) The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 53 (4): 369-377.
76. Kuzon WM, Jr., Walker PM, Mickle DA, Harris KA, Pynn BR, McKee NH. (1986) An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies. *J Surg Res*, 41 (1): 24-32.
77. Rubin BB, Liauw S, Tittley J, Romaschin AD, Walker PM. (1992) Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, 262 (5): H1538-H1547.
78. da Cruz CA, Massuda CA, Cherri J, Piccinato CE. (1997) Metabolic alterations of skeletal muscle during ischaemia and reperfusion. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 38 (5): 473-477.
79. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. (1990) The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 12 (1): 8-15.
80. Anderson RJ, Cambria R, Kerr J, Hobson RW, 2nd. Sustained benefit of temporary limited reperfusion in skeletal muscle following ischemia. *J Surg Res*, Vol. 49: United States, 1990, pp 271-275.
81. Wang WZ, Fang X-H, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. (2008) Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res*, 26 (3): 351-356.
82. Gordon L, Buncke HJ, Townsend JJ. (1978) Histological changes in skeletal muscle after temporary independent occlusion of arterial and venous supply. *Plast Reconstr Surg*, 61 (4): 576-579.

83. Swartz WM, Cha CJ, Clowes GH, Jr., Randall HT. (1978) The effect of prolonged ischemia on high energy phosphate metabolism in skeletal muscle. *Surg Gynecol Obstet*, 147 (6): 872-876.
84. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. (2004) Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascul Pharmacol*, 41 (4-5): 125-129.
85. Hirose J, Yamaga M, Ide J, Tanoue M, Takagi K. (1997) Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle. Experiments in rats with EPC-K1, a new radical scavenger. *Acta Orthop Scand*, 68 (4): 369-373.
86. Kabaroudis A, Gerassimidis T, Karamanos D, Papaziogas B, Antonopoulos V, Sakantamis A. (2003) Metabolic alterations of skeletal muscle tissue after prolonged acute ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*, 16 (4): 219-228.
87. Miller HH, Welch CS. (1949) Quantitative Studies on the Time Factor in Arterial Injuries. *Ann Surg*, 130 (3): 428-438.
88. Duehrkop C, Denoyelle J, Shaw S, Rieben R. (2013) Use of dextran sulfate in tourniquet-induced skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res*, article in press.
89. Ludatscher RM, Hashmonai M, Monies-Chass I, Schramek A. (1981) Progressing alterations in transient ischemia of skeletal muscles: an ultrastructural study. *Acta Anat (Basel)*, 111 (4): 320-327.
90. Jennische E. (1985) Ischaemia-induced injury in glycogen-depleted skeletal muscle. Selective vulnerability of FG-fibres. *Acta Physiol Scand*, 125 (4): 727-734.
91. Troitzsch D, Vogt S, Abdul-Khaliq H, Moosdorf R. (2005) Muscle tissue oxygen tension and oxidative metabolism during ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 128 (1): 9-14.
92. Marian CF, Jiga LP, Ionac M. (2005) Ischemic preconditioning of free muscle flaps: An experimental study. *Microsurgery*, 25 (7).
93. Esmarch F. (1873) Über künstliche blutleere bei operationen. *Volkmanns Sammlung Klinischer Vorträge*, 58: 373–384.
94. Estebe JP, Davies JM, Richebe P. (2011) The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol*, 28 (6): 404-411.

95. Barie PS, Mullins RJ. (1988) Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res*, 44 (3): 284-307.
96. Malan E, Tattoni G. (1963) Physio- and anatomo-pathology of acute ischemia of the extremities. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 4: 212-225.
97. Paletta FX, Willman V, Ship AG. (1960) Prolonged tourniquet ischemia of extremities an experimental study on dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 42 (6): 945-950.
98. Seifert FC, Banker M, Lane B, Bagge U, Anagnostopoulos CE. (1985) An evaluation of resting arterial ischemia models in the rat hind limb. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 26 (5): 502-508.
99. Weiss L. (1974) Aspects of the relation between functional and structural cardiovascular factors in primary hypertension. Experimental studies in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand Suppl*, 409: 1-58.
100. Bushell AJ, Klenerman L, Taylor S, Davies H, Grierson I, Helliwell TR, Jackson MJ. (2002) Ischaemic preconditioning of skeletal muscle. 1. Protection against the structural changes induced by ischaemia/reperfusion injury. *J Bone Joint Surg Br*, 84 (8): 1184-1188.
101. Janda J, Linhart J, Kasalicky J. (1974) Experimental chronic ischaemia of the skeletal muscle in the rat. *Physiol Bohemoslov*, 23 (6): 521-526.
102. Kohout M, Poledne R, Janda J, Linhart J. (1976) Blood flow and transport of free fatty acids in striated muscle under chronic ischemia. *Pflugers Arch*, 367 (1): 49-53.
103. Hendricks DL, Pevcec WC, Shestak KC, Rosenthal MC, Webster MW, Steed DL. (1990) A model of persistent partial hindlimb ischemia in the rabbit. *J Surg Res*, 49 (5): 453-457.
104. Janda J, Urbanova D, Mrhova O, Linhart J. (1972) The effect of muscular work on the activities of certain enzymes in skeletal muscle in chronic muscular ischaemia. *Cor Vasa*, 14 (4): 312-320.
105. Rab M, Neumayer C, Koller R, Kamolz LP, Haslik W, Gassner R, Giovanoli P, Schaden G, Frey M. (2000) Histomorphology of rabbit thigh muscles: establishment of standard control values. *J Anat*, 196: 203-209.

106. Holmes JH, Painter EE. (1947) The role of the extracellular fluid in traumatic shock in dogs. *Am J Physiol*, 148 (1): 201-210.
107. Hamori J, Kovach AG, Takacs L, Takacs-Nagy L, T-Szabo M, Zachariev G. (1956) Regeneration in the biochemical, functional and histological changes found in the muscle of rats after ischaemic shock. *Acta Physiol Hung*, 10 (2-4): 313-325.
108. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B. (2011) Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg*, 98 (4): 511-516.
109. Hanzlikova V, Gutmann E. (1979) Effect of ischemia on contractile and histochemical properties of the rat soleus muscle. *Pflugers Arch*, 379 (2): 209-214.
110. Bass A, Gutmann E, Hanzlikova V, Teisinger J. (1979) Effects of ischaemia on enzyme-activities in the soleus muscle of the rat. *Pflugers Arch*, 379 (2): 203-208.
111. Colburn MD, Quinones-Baldrich WJ, Gelabert HA, Nowara H, Moore WS. Standardization of skeletal muscle ischemic injury. *J Surg Res*, Vol. 52: United States, 1992, pp 309-313.
112. Kost GJ. (1984) Surface pH of the medial gastrocnemius and soleus muscles during hemorrhagic shock and ischemia. *Surgery*, 95 (2): 183-190.
113. Scully RE, Shannon JM, Dickersin GR. (1961) Factors Involved in Recovery from Experimental Skeletal Muscle Ischemia Produced in Dogs: I. Histologic and Histochemical Pattern of Ischemic Muscle. *Am J Pathol*, 39 (6): 721-737.
114. Stenger RJ, Spiro D, Scully RE, Shannon JM. (1962) Ultrastructural and physiologic alterations in ischemic skeletal muscle. *Am J Pathol*, 40: 1-20.
115. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2011) The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol*, 8 (11): 619-629.
116. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. (2015) Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth*, 114 (2): 204-216.
117. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. (1996) Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces

- the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J*, 132 (1 Pt 1): 78-83.
118. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285 (2): H579-H588.
 119. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. (2006) Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res*, 70 (2): 308-314.
 120. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2004) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 62 (1): 74-85.
 121. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. (2005) Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*, 67 (1): 124-133.
 122. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288 (4): H1900-1908.
 123. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. (2005) Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (4): H1618-1626.
 124. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. (2004) Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25 (6): 1006-1010.
 125. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. (2004) Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*, 95 (3): 230-232.

126. Zhang WH, Lu FH, Zhao YJ, Wang LN, Tian Y, Pan ZW, Lv YJ, Wang YL, Du LJ, Sun ZR, Yang BF, Wang R, Xu CQ. (2007) Post-conditioning protects rat cardiomyocytes via PKCepsilon-mediated calcium-sensing receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 361 (3): 659-664.
127. Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. (2001) Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280 (1): H256-263.
128. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. (1993) Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res*, 72 (1): 112-125.
129. Zhao ZQ. (2010) Postconditioning in reperfusion injury: a status report. *Cardiovasc Drugs Ther*, 24 (3): 265-279.
130. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY. (2008) Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295 (2): R681-689.
131. Yan H, Zhang F, Kochevar AJ, Akdemir O, Gao W, Angel M. (2010) The effect of postconditioning on the muscle flap survival after ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg*, 23 (5): 249-256.
132. Park JW, Kang JW, Jeon WJ, Na HS. (2010) Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery*, 30 (3): 223-229.
133. Guo XS, Li YZ, Liu XH, Zhang ZY, Liu FY, Hu WC. (2011) Calcineurin mediates the protective effect of postconditioning on skeletal muscle. *Shock*, 36 (3): 312-316.
134. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli JP, Zoll J, Geny B. (2012) Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg*, 56 (3): 774-782.e771.
135. Liang H, Yu F, Tong Z, Yuan B, Wang C. (2013) Effect of ischemia post-conditioning on skeletal muscle oxidative injury, mTOR, Bax, Bcl-2 proteins expression, and HIF-1alpha/beta-actin mRNA, IL-6/beta-actin mRNA and

- caveolin-3/beta-actin mRNA expression in ischemia-reperfusion rabbits. *Mol Biol Rep*, 40 (1): 507-514.
136. Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Postconditioning of the lower limb - Protection against the reperfusion syndrome. *J Surg Res*, 169 (1): 139-147.
 137. Goldfischer S. (1967) The cytochemical localization of myoglobin in striated muscle of man and walrus. *J Cell Biol*, 34 (1): 398-403.
 138. Fogarty TJ, Cranley JJ, Krause RJ, Strasser ES, Hafner CD. (1963) A method for extraction of arterial emboli and thrombi. *Surg Gynecol Obstet*, 116: 241-244.
 139. Lund T, Olsen S. (1970) Idiopathic renal lipofuscinosis. Two cases. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 78 (4): 414-420.
 140. Szijarto A, Hahn O, Lotz G, Schaff Z, Madarasz E, Kupcsulik PK. (2006) Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J Surg Res*, 131 (1): 150-157.
 141. Ciena AP, de Almeida SR, Alves PH, Bolina-Matos Rde S, Dias FJ, Issa JP, Iyomasa MM, Watanabe IS. (2011) Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged Wistar rats. *Micron*, 42 (8): 871-876.
 142. Nanobashvili J, Neumayer C, Fugl A, Punz A, Blumer R, Prager M, Mittlbock M, Gruber H, Polterauer P, Roth E, Malinski T, Huk I. (2003) Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: Plasma taurine as a measure of tissue damage. *Surgery*, 133 (1): 91-100.
 143. Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, Park YS, Sokolow D. (1985) Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study. *J Bone Joint Surg Am*, 67A (2): 303-314.
 144. Wei X, Zhang Z, Han L, Wei Y. (1998) Protective effect of anisodamine on reperfusion injury of skeletal muscles in rabbit. *Acta Orthop Scand*, 69 (6): 633-637.
 145. Presta M, Ragnotti G. (1981) Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia. *Clin Chem*, 27 (2): 297-302.
 146. da Silva MG, Castro AA, Ramos EA, Peixoto E, Miranda F, Jr., Pitta Gde B, Costa Rde F, Juliano Y. Histological and biochemical serum effects of alpha-

- tocopherol on ischemia/reperfusion-related injuries induced in the pelvic limb of rats. *Acta Cir Bras*, Vol. 20: Brazil, 2005, pp 375-381.
147. Makitie J, Teravainen H. (1977) Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. *Acta Neuropathol*, 37 (2): 101-109.
 148. Welbourn R, Goldman G, O'Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1991) Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol*, 70 (6): 2645-2649.
 149. Haacke N, Unger JK, Haidenhein C, Russ M, Hiebl B, Niehues SM. (2011) Pig specific vascular anatomy allows acute infrarenal aortic occlusion without hind limb ischemia and stepwise occlusion without clinical signs. *Clin Hemorheol Microcirc*, 48 (1): 173-185.
 150. Schaub RG, Meyers KM, Sande RD, Hamilton G. (1976) Inhibition of feline collateral vessel development following experimental thrombotic occlusion. *Circ Res*, 39 (5): 736-743.
 151. Braithwaite JL. (1954) The morphology of the collateral circulation following complete interruption of the abdominal aorta in the rat. *J Anat*, 88 (2): 204-211.
 152. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy of the laboratory rat*, Burns & McEachern: Don Mills, Ontario, Canada, 1976.
 153. Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. (1975) Ischemic tissue injury. *Am J Pathol*, 81 (1): 179-198.
 154. Karpati G, Carpenter S, Melmed C, Eisen AA. (1974) Experimental ischemic myopathy. *J Neurol Sci*, 23 (1): 129-161.
 155. Jennings RB. (1969) Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *Am J Cardiol*, 24 (6): 753-765.
 156. Merrick MA, Rankin JM, Andres FA, Hinman CL. (1999) A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 31 (11): 1516-1521.
 157. Wang JX, Li Y, Zhang LK, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Zhang J. (2005) Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits. *Acta Pharmacol Sin*, 26 (7): 821-827.

158. Troitzsch D, Moosdorf R, Vogt S. (2011) Importance of real-time tissue oximetry: relationship to muscle oxygenation and tissue viability. *J Surg Res*, 169 (1): 156-161.
159. Troitzsch D, Moosdorf R, Hasenkam JM, Nygaard H, Vogt S. (2013) Effects of cyclosporine pretreatment on tissue oxygen levels and cytochrome oxidase in skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Shock*, 39 (2): 220-226.
160. Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA, Stewart AG. (2001) Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*, 424 (1): 59-67.
161. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. (2010) Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 40 (6): 804-809.
162. Walters TJ, Mase VJ, Jr., Roe JL, Dubick MA, Christy RJ. (2011) Poloxamer-188 reduces muscular edema after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *J Trauma*, 70 (5): 1192-1197.
163. Cahoon NJ, Naparus A, Ashrafpour H, Hofer SO, Huang N, Lipa JE, Forrest CR, Pang CY. (2013) Pharmacologic prophylactic treatment for perioperative protection of skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*, 131 (3): 473-485.
164. Homer-Vanniasinkam S, Rowlands TE, Hardy SC, Gough MJ. (2001) Skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury: further characterisation of a rodent model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 22 (6): 523-527.
165. Carmo-Araujo EM, Dal-Pai-Silva M, Dal-Pai V, Cecchini R, Anjos Ferreira AL. (2007) Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol*, 88 (3): 147-154.
166. Miedema JR, Hunt HV. (2010) Practical issues for frozen section diagnosis in gastrointestinal and liver diseases. *J Gastrointest Liver Dis*, 19 (2): 181-185.
167. Schmidt RL, Hunt JP, Hall BJ, Wilson AR, Layfield LJ. (2011) A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of frozen section for parotid gland lesions. *Am J Clin Pathol*, 136 (5): 729-738.

168. Heatley MK. (2012) A systematic review of papers examining the use of intraoperative frozen section in predicting the final diagnosis of ovarian lesions. *Int J Gynecol Pathol*, 31 (2): 111-115.
169. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. (1981) The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch A*, 393 (3): 287-297.
170. Chan RK, Austen WG, Jr., Ibrahim S, Ding GY, Verna N, Hechtman HB, Moore FD, Jr. (2004) Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J Surg Res*, 122 (1): 54-60.
171. Idstrom JP, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC. (1990) Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 258 (6 Pt 2): H1668-1673.
172. Blaisdell FW. (2002) The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 10 (6): 620-630.
173. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. (2011) Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg*, 128 (6): 685e-692e.
174. Bryant RE, Thomas WA, O'Neal RM. (1958) An electron microscopic study of myocardial ischemia in the rat. *Circ Res*, 6 (6): 699-709.
175. Moore DH, Ruska H, Copenhaver WM. (1956) Electron microscopic and histochemical observations of muscle degeneration after tourniquet. *J Biophys Biochem Cytol*, 2 (6): 755-764.
176. van der Slegt J, Flu HC, Veen EJ, Ho GH, de Groot HG, Vos LD, van der Laan L. (2015) Adverse events after treatment of patients with acute limb ischemia. *Ann Vasc Surg*, 29 (2): 293-302.
177. Regensteiner JG, Wolfel EE, Brass EP, Carry MR, Ringel SP, Hargarten ME, Stamm ER, Hiatt WR. (1993) Chronic changes in skeletal muscle histology and function in peripheral arterial disease. *Circulation*, 87 (2): 413-421.
178. Urbanova D, Janda J, Mrhova O, Linhart J. (1974) Enzyme changes in the ischaemia of skeletal muscle and the effect of physical conditioning. A histochemical study. *Histochem J*, 6 (2): 147-155.
179. Albani M, Kiskinis D, Natsis K, Megalopoulos A, Gigis P, Guiba-Tziampiri O. (2000) Histochemical and ultrastructural characteristics of leg muscle fibres in

- patients with repairative abdominal aortic aneurysm (AAA). *Anat Rec*, 260 (1): 1-15.
180. McGuigan MR, Bronks R, Newton RU, Sharman MJ, Graham JC, Cody DV, Kraemer WJ. (2001) Muscle fiber characteristics in patients with peripheral arterial disease. *Med Sci Sports Exerc*, 33 (12): 2016-2021.
 181. Schocke M, Esterhammer R, Greiner A. (2008) High-energy phosphate metabolism in the exercising muscle of patients with peripheral arterial disease. *Vasa*, 37 (3): 199-210.
 182. Askew CD, Green S, Walker PJ, Kerr GK, Green AA, Williams AD, Febbraio MA. (2005) Skeletal muscle phenotype is associated with exercise tolerance in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*, 41 (5): 802-807.
 183. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. (2010) Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*, 87 (3): 406-423.
 184. Strock PE, Majno G. (1969) Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet*, 129 (2): 309-318.
 185. Jennings RB, Reimer KA. (1981) Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*, 102 (2): 241-255.
 186. Crinnion JN, Homer-Vanniasinkam S, Parkin SM, Gough MJ. (1996) Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg*, 83 (2): 251-254.
 187. Dahlback LO, Rais O. (1966) Morphologic changes in striated muscle following ischemia. Immediate postischemic phase. *Acta Chir Scand*, 131 (6): 430-440.
 188. Allbrook D, Baker Wde C, Kirkaldy-Willis WH. (1966) Muscle regeneration in experimental animals and in man. The cycle of tissue change that follows trauma in the injured limb syndrome. *J Bone Joint Surg Br*, 48 (1): 153-169.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Szijarto A, Turoczi Z, Aranyi P, Garbaisz D, Varga M, Stangl R, Lotz G, Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. [Long ischemic period of the lower limb--study of skeletal muscle viability in experimental animal models]. Magy Seb, 63 (6): 374-379.

Szijarto A, Turoczi Z, Aranyi P, Nagy Z, Gyurkovics E. (2010) Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. [Acute and critical ischemia of the lower limb]. Orv Hetil, 151 (50): 2057-2066.

Szijarto A*, Turoczi Z*, Szabo J, Kaliszky P, Gyurkovics E, Aranyi P, Regali L, Harsanyi L, Lotz G. (2013) Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb. Cardiovasc Path, 22 (6): 493-500.
IF: 2.336 * megosztott elsőszerezős közlemény

Turóczi Zs, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Muscle Fiber Viability, a Novel Method for the Fast Detection of Ischemic Muscle Injury in Rats. PLoS ONE, 9 (1): e84783. IF: 3,534

Turoczi Z, Fulop A, Lukats A, Garbaisz D, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Postconditioning protects skeletal muscle against a long-lasting vascular occlusion. J Invest Surg, 27 (5): 282-290. IF: 1,191

Rosero O, Nemeth K, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Gyorffy A, Szuak A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskeri A, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies. Surg Today, 44 (12): 2345-2353. IF: 1,208

Az értekezés témájában megjelent közlemények összesített impakt faktora: 8.269

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Gyurkovics E, Arányi P, Turóczi Zs, Garbaisz D, Varga M, Hegedüs V, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. *Int Med Appl Sci*, 2 (4): 169-177.

Arányi P, Turóczi Zs, Garbaisz D, Varga M, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Posztokondicionálás: érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére. Állatkísérletes eredmények. *Hypertonia és Nephrologia*, 15 (3): 117-124.

Szijártó A, Fülöp A, Turóczi Zs, Garbaisz D, Dudás E, Szabó J, Nánási R, Kupcsulik P. (2011) Rupturált hasi aorta aneurysma kísérletes modellje. A folyadék reszuscitáció technikai megfontolásai. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*, 41 (2): 61-70.

Czigány Z, Turóczi Zs, Bulhardt O, Hegedüs V, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs, Harsányi L, Szijártó A. (2012) Távoli szervi kondicionálás: rövid távú hepatoprotectiv hatások patkánymodellben. [Remote ischemic conditioning: short-term effects on rat liver ischemic-reperfusion injury]. *Orv Hetil*, 153 (40): 1579-1587.

Czigany Z, Turoczi Z, Onody P, Harsanyi L, Lotz G, Hegedus V, Szijarto A. (2013) Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 185 (2): 605-613. IF: 2,121

Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, Rosero O, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. *J Surg Res*, 185 (1): 469-476. IF: 2,121

Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, Rosero O, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Alsó végtagi ischaemiás-reperfúziós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése posztokondicionálással. [Postconditioning can reduce long-term lung injury after lower limb ischemia-reperfusion]. *Magy Seb*, 66 (3): 146-154.

Onody P, Stangl R, Fulop A, Rosero O, Garbaisz D, Turoczi Z, Lotz G, Rakonczay Z Jr, Balla Z, Hegedus V, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury? PLoS ONE, 8 (9): e73758. IF: 3,534

Garbaisz D, Turoczi Z, Aranyi P, Fulop A, Rosero O, Hermes E, Ferencz A, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811. PLoS ONE, 9 (6): e101067. IF: 3,534

Rosero O, Ónody P, Kovács T, Molnár D, Lotz G, Tóth Sz, Turóczi Zs, Fülöp A, Garbaisz D, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Impaired intestinal mucosal barrier upon ischemia-reperfusion: “patching holes in the shield with a simple surgical method”. Biomed Research Int, 2014: 210901. IF: 2,706

Rosero O, Onody P, Stangl R, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model? J Surg Res, 2014; 187 (2): 427-437. IF: 2.121

Aranyi P, Turoczi Zs, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, Balla Zs, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. BMC J Transl Med, 13 (1): 21. IF: 3.99

Czigany Z, Turoczi Z, Kleiner D, Lotz G, Homeyer A, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Neural elements behind the hepatoprotection of remote preconditioning. J Surg Res, 193 (2): 642-651. IF: 2.121

Turóczi Zs, Fülöp A, Czigány Z, Varga G, Rosero O, Tökés T, Kaszaki J, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2015) Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia. Microvasc Res, 98: 119-125. IF: 2.432

Megjelent in extenso közlemények összesített impakt faktora: 32,949.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Szijártó Attilának* a szüntelen támogatásért és biztatásért, illetve kifogyhatatlan türelméért, amivel munkámat segítette!

Köszönöm *Dr. Kupcsulik Péter*, illetve *Dr. Harsányi László Professzor Uraknak*, hogy megteremtették a feltételeket egy tartalmas és színvonalas kutatómunka elvégzéséhez!

Köszönöm *Dr. Gyurkovics Endrének* a témaválasztásban nyújtott segítségét!

Külön köszönet illeti *Dr. Lotz Gábort* a szövettani minták feldolgozásában, kiértékelésében végzett munkájáért!

Köszönöm szépen *Dr. Lukáts Ákosnak*, illetve *Dr. Röhlich Pál Professzor Úrnak* az elektronmikroszkópos vizsgálatok során nyújtott sok segítséget!

Köszönöm továbbá *Dr. Arányi Péternek*, *Dr. Czigány Zoltánnak*, *Dr. Dudás Emesének*, *Dr. Ferreira Gábornak*, *Dr. Fülöp Andrásnak*, *Dr. Garbaisz Dávidnak*, *Dr. Hegedüs Viktornak*, *Dr. Ónody Péternek*, *Dr. Rosero Olivérnek*, *Dr. Stangl Ritának*, *Dr. Szabó Józsefnek* és *Dr. Varga Márknak* a sok segítséget fáradtságot, türelmet és megértést, amivel lehetővé tették, hogy ez a dolgozat elkészülhessen!

Köszönöm *Dr. Sági Zoltán Professzor Úrnak* és *Dr. Telek Gézának*, hogy dolgozatom házi bírálata során építő kritikájukkal segítséget nyújtottak egy magasabb színvonalú munka elkészülésében!

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *Szüleimnek*, *Nagyszüleimnek*, *Testvéremnek*, valamint *Családom többi tagjának* mindazt a megértést, melyet a dolgozat megírása során velem szemben tanúsítottak, illetve a sok segítséget, amivel hozzájárultak a végleges forma összeállításához!